

Aus der Forschung Pharma der Schering AG

Berlin/Bergkamen

Leiter: Professor Dr. med. Martin Kramer

**VERTEILUNG VON 1-BUTYL-BIGUANID-¹⁴C
IM ORGANISMUS DES
MEERSCHWEINCHENS UND DER RATTE**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde

der Medizinischen Fachbereiché

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

GISELA BITTERLING

Berlin

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Forschung Pharma der Schering AG

Berlin/Bergkamen

Leiter: Professor Dr. med. Martin Kramer

**VERTEILUNG VON 1-BUTYL-BIGUANID-¹⁴C
IM ORGANISMUS DES
MEERSCHWEINCHENS UND DER RATTE**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde

der Medizinischen Fachbereiché

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

GISELA BITTERLING

Berlin

Referent : Professor Dr.med. Martin Krämer
Korreferent : Professor Dr. med. Norbert Rietbrock



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am : 13. Oktober 1971

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	5
2.	METHODIK.....	10
2.1.	Tiermaterial.....	10
2.2.	Bestimmung der Verteilung und Ausscheidung von 1-Butyl-Biguanid- ¹⁴ C bei Ratten und Meerschweinchen.....	10
2.2.1.	Substanzapplikation.....	10
2.2.1.1.	Versuche an Ratten.....	10
2.2.1.2.	Versuche an Meerschweinchen.....	11
2.2.2.	Versuchsablauf.....	11
2.2.3.	Aufarbeitung der Gewebe.....	11
2.2.4.	Statistische Auswertung.....	13
2.3.	Bestimmung der Eiweißbindung von 1-Butyl-Biguanid- ¹⁴ C.....	14
2.4.	Schätzung der extra- und intrazellulären Konzentrationen der Radioaktivität in der Leber und Skelettmuskulatur.....	16
2.5.	Autoradiographische Untersuchungen an Ratten nach Behandlung mit 1-Butyl-Biguanid- ¹⁴ C.....	17
2.5.1.	Ganztierautoradiographie.....	17
2.5.2.	Mikroautoradiographische Untersuchungen der Skelettmuskulatur.....	18
3.	ERGEBNISSE.....	20
3.1.	Verteilung und Ausscheidung von 1-Butyl-Biguanid- ¹⁴ C bei Ratten.....	20
3.1.1.	Ausscheidung.....	20
3.1.2.	Verteilung in verschiedenen Geweben.....	21
3.1.3.	Vergleich der Radioaktivität im Blut und Plasma.....	24
3.1.4.	Eiweißbindung von 1-Butyl-Biguanid- ¹⁴ C im Plasma.....	25
3.1.5.	Schätzung der intrazellulären Radioaktivitätskonzentrationen in der Leber und Skelettmuskulatur.....	26
3.1.6.	Autoradiographische Untersuchungen.....	29
3.1.6.1.	Ganztierautoradiographie.....	29
3.1.6.2.	Mikroautoradiographie der Skelettmuskulatur.....	32

3.2.	Verteilung und Ausscheidung von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C bei Meerschweinchen..	40
3.2.1.	Ausscheidung.....	40
3.2.2.	Verteilung in verschiedenen Geweben.....	41
3.2.2.1.	Untersuchungen nach subcutaner Injektion von 20 mg/kg.....	41
3.2.2.2.	Untersuchung nach oraler Gabe von 10 mg/kg.....	42
3.2.3.	Vergleich der Radioaktivität im Blut und Plasma.....	46
3.2.4.	Eiweißbindung von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C im Plasma.....	47
3.2.5.	Schätzung der intrazellulären Radioaktivitätskonzentrationen in der Leber und Skelettmuskulatur.....	47
4.	DISKUSSION.....	50
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	58
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	62

1. EINLEITUNG

In der Therapie des Altersdiabetes werden zwei Arten oral anwendbarer Verbindungen verwendet. Während die Wirkungsweise der Sulfonylharnstoffe und Sulfonylpyrimidine im wesentlichen auf einer Freisetzung von Insulin aus den Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse beruht (PFEIFFER, SCHÖFFLING und DITSCHUNEIT, 1969; s.d. weit. Lit.), ist es bisher nicht gelungen, den Wirkungsmechanismus der zweiten Substanzklasse, der Biguanide, eindeutig aufzuklären (SÖLING und DITSCHUNEIT, 1969). Untersuchungen zur Beantwortung dieser Frage werden dadurch kompliziert, daß Biguanide in Abhängigkeit von der applizierten Dosis offenbar entgegengesetzte Stoffwechseleffekte ausüben. Diese Verbindungen erniedrigen in Dosen, die den therapeutischen Bereich erheblich überschreiten, bei verschiedenen Tierarten die Glucosekonzentration im Blut (SÖLING und DITSCHUNEIT, 1969; BECKMANN, 1968a; s.d. weit. Lit.). Dieser Effekt beruht auf einer insulinunabhängigen Hemmung der Gluconeogenese in den dazu befähigten Geweben und einer Steigerung des Glucoseverbrauches infolge einer Erhöhung der Glykolyse bei gleichzeitiger Einschränkung der Glucoseoxydation (WILLIAMS, TYBERGHEIN, HYDE und NIELSEN, 1957; STEINER und WILLIAMS, 1958; FORBATH und CLARKE, 1959; RAFAELSEN, 1959; WILLIAMSON, WALKER und RENOLD, 1963; MEYER, IPAKTCI und CLAUSER, 1967; HAECKEL und HAECKEL, 1968; JANGAARD, PEREIRA und PINSON, 1968; PATRICK, 1966, 1968; ALTSCHULD und KRUGER, 1968; LOSERT, LOGE und SCHILLINGER, 1969; SÖLING und DITSCHUNEIT, 1969; LOSERT, KRAAZ und SCHILLINGER, 1971). Alle diese Wirkungen lassen sich durch eine Störung der Zellatmung, d.h. Behinderung des Elektronentransportes in der Atmungskette, erklären (FALCONE, MAC und SHRAGO, 1962; PRESSMAN, 1963a, 1963b; SCHÄFER, 1963, 1964). Infolge dieser Einschränkung der Endoxydation kommt es zu einer Senkung der Sauerstoffauf-

nahme, Einschränkung der Oxydation von Glucose und Pyruvat zu Kohlensäure, Hemmung der NAD-abhängigen Oxydationsschritte im Tricarbonsäurecyclus und damit letzten Endes zu einer Erniedrigung der ATP-Konzentration (UNGAR, PSYCHOYOS und HALL, 1960; DITSCHUNEIT, LOTZ, FRITZSCHE und PFEIFFER, 1961; WILLIAMSON, WALKER und RENOLD, 1963; ALTSCHULD und KRUGER, 1968; JANGAARD, PEREIRA und PINSON, 1968; LOSERT, LOGE und SCHILLINGER, 1969; LOSERT, KRAAZ, JAHN und RILKE, 1970). Bei einem ATP-Mangel nimmt die Aktivität gluconeogenetischer Schlüsselenzyme (Pyruvatcarboxylase, Phosphoenolpyruvatcarboxykinase) ab, während die Umsatzgeschwindigkeit eines für die Glykolyse geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms, der Phosphofruktokinase, ansteigt (ATKINSON, 1966; PATRICK, 1968). Die im Tierexperiment beobachtete Erniedrigung der Blutglucose resultiert demnach aus einer verminderten Neubildung und einem gesteigerten glykolytischen Abbau des Zuckers bei gleichzeitiger Hemmung des oxydativen Stoffwechsels. Infolge dessen wird in vermehrtem Maße Laktat gebildet, und die Milchsäurekonzentration im Blut steigt an (TYBERGHEIN und WILLIAMS, 1957; CREUTZFELDT, 1959; UNGAR, 1959; SÖLING und CREUTZFELDT, 1960; WILLIAMSON, WALKER und RENOLD, 1963; SÖLING, WERCHAU und CREUTZFELDT, 1963; SÖLING, KNEER, MOSHAGEN, SKUTELLA und CREUTZFELDT, 1967; LOSERT, SCHILLINGER und KRAAZ, 1971).

Im Gegensatz zu diesen als toxisch anzusehenden Effekten hoher Biguaniddosen sprechen klinische und experimentelle Untersuchungen am Menschen dafür, daß durch therapeutische Dosen dieser Verbindungen der oxydative Glucosestoffwechsel gesteigert wird. SEARLE und Mitarbeiter (SEARLE, SCHILLING, PORTE, BARBACCIA, DE GRAZIA und CAVALIERI, 1966; SEARLE und CAVALIERI, 1968; SEARLE, GULLI und CAVALIERI, 1969) beobachteten bei gesunden Versuchspersonen unter dem Einfluß von N^1, β -Phenyläthyl-Biguanid (Phenformin) eine Steigerung der Glucoseaufnahme und -oxydation in der Körperperipherie (Skelettmuskulatur). Dieser Befund basiert auf einer Bestim-

mung der spezifischen Aktivität der Blutglucose und der Kohlensäure in der Ausatemungsluft nach intravenöser Injektion von ^{14}C -Glucose. Zugleich nahm die Glucosekonzentration im Blut jedoch nicht ab, da der vermehrte Glucoseverbrauch in der Muskulatur durch eine erhöhte Glucoseabgabe aus der Leber ausgeglichen wurde. Die Tatsache, daß eine blutzuckersenkende Wirkung von Biguaniden in therapeutischer Dosierung nur beim Diabetiker auftritt (FAJANS, MOORHOUSE, DOORENBOS, LAWRENCE und CONN, 1960; OTTO, 1960; SÖLING, WERCHAU und CREUTZFELDT, 1961; SEARLE und CAVALIERI, 1968), wurde dadurch erklärt, daß die bei einem Insulinmangel bereits erhöhte Gluconeogenese nicht mehr im gleichen Maße gesteigert werden kann wie beim gesunden Menschen, so daß in der Bilanz die vermehrte periphere Glucoseaufnahme überwiegt. Für eine Verbesserung der Glucoseaufnahme und -utilisation durch Biguanide beim Menschen sprechen auch die Befunde von GOMEZ und FELBER (GOMEZ, BÜBER und FELBER, 1969; GOMEZ und FELBER, 1970; GOMEZ, JÉQUIER, RÜEDI und FELBER, 1970). Diese Autoren fanden, daß bei gesunden Versuchspersonen nach Vorbehandlung mit N^1 -Butyl-Biguanid (1-Butyl-Biguanid¹⁾) die Glucoseelimination aus dem Blut nach einmaliger intravenöser Injektion von Glucose nicht beschleunigt ist, jedoch nach einer mehrstündigen Glucoseinfusion signifikant niedrigere Blutglucosekonzentrationen auftreten als ohne Applikation der Verbindung. Zugleich nahm der respiratorische Quotient zu.

Dieser Effekt der Biguanide beim Menschen ist im Gegensatz zur blutzuckersenkenden Wirkung beim Tier an die Anwesenheit von Insulin gebunden. Eine therapeutische Wirkung wird nur beobachtet, wenn die Bauchspeicheldrüse noch Insulin produ-

1) Der bisherige "generic name" Buformin wurde vor kurzem von einer pharmazeutischen Firma als Handelsname patentiert. Da die WHO noch keinen neuen internationalen Freinamen festgesetzt hat, wird die Substanz in der vorliegenden Arbeit als 1-Butyl-Biguanid bezeichnet.

ziert (STERNE, 1964; MEHNERT, 1968; CREUTZFELDT, APPELS, KATTERMANN, FRERICHS, PROSCHEK, HUBRICH und SÖLING, 1968; HAENSE, 1969; WERNER, 1969; SÖLING und DITSCHUNEIT, 1969).

Es wird daher angenommen, daß Biguanide beim Diabetiker die Wirkung des im verminderten Maße sezernierten Insulins verstärken. Worauf dieser Effekt beruht, ist noch unklar. BUTTERFIELD und WHICHELOW vermuten aufgrund von Perfusionsversuchen am Unterarm von Diabetikern, daß durch Biguanide Insulin in gesteigertem Maße am Wirkort, d. h. den Muskelzellen, gebunden wird und dadurch die zelluläre Glucoseaufnahme zunimmt (BUTTERFIELD, 1968; BUTTERFIELD und WHICHELOW, 1968; WHICHELOW und BUTTERFIELD, 1969; BUTTERFIELD, 1969).

Befunde, die in jüngerer Zeit veröffentlicht wurden, sprechen dafür, daß eine gleichartige Verstärkung der insulinabhängigen Glucoseaufnahme und -utilisation auch im Tierexperiment durch niedrige, noch nicht blutzuckersenkende Biguaniddosen hervorgerufen werden kann (SCHILLINGER, KRAAZ, LOGE und LOSERT, 1970; LOSERT, KRAAZ, JAHN und RILKE, 1970; LOSERT, SCHILLINGER, LOGE und KRAAZ, 1970; LOSERT, KRAAZ und SCHILLINGER, 1971; KRAAZ, 1971). Diese Untersuchungen wurden an Ratten und Meerschweinchen durchgeführt. Ratten reagierten erst auf eine orale Applikation von mehr als 150 mg/kg oder eine subcutane Injektion von mehr als 75 mg/kg 1-Butyl-Biguanid mit einer toxischen Blutglucoseerniedrigung. Nach dreimaliger Gabe von 17,5 oder 35 mg/kg der Substanz verbesserte sich jedoch die intravenöse Glucosetoleranz sowie die Glucoseaufnahme und -oxydation in der Körperperipherie, ohne daß dabei eine direkte Beeinflussung der Glucosekonzentration im Blut auftrat. Es ergab sich kein Anhalt für eine zusätzliche Hemmung der Gluconeogenese in der Leber. Bei Meerschweinchen, die auf Biguanide generell empfindlicher reagieren, wurde eine schwere Hypoglykämie schon nach subcutaner Injektion von 20 mg/kg 1-Butyl-Biguanid gemessen (LOSERT, SCHILLINGER und KRAAZ, 1971), während nach mehrmaliger subcutaner Injektion von 2,5 oder 5 mg/kg eine Steigerung der Oxydation von ^{14}C -U-Glucose auftrat, die in gleicher Weise wie bei Ratten nicht von einer

Erniedrigung der Blutglucose begleitet war. Diese Dosen liegen in dem aus der therapeutischen Anwendung der Verbindung bekannten Bereich. Die Tagesdosis zur Behandlung eines Diabetikers beträgt bei einem Körpergewicht von 70 kg 200 mg 1-Butyl-Biguanid, d.h. etwa 3 mg/kg.

Aufgrund der humanpharmakologischen Experimente von BUTTERFIELD und Mitarbeitern sowie der zitierten tierexperimentellen Befunde, muß angenommen werden, daß die Skelettmuskulatur in erster Linie Wirkort der Biguanide ist.

Von diesen Überlegungen ausgehend wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, in welcher Weise sich 1-Butyl-Biguanid nach Applikation niedriger, nicht blutzuckersenkender Dosen im Organismus der Ratte und des Meerschweinchens verteilt und ob möglicherweise eine Anreicherung in der Skelettmuskulatur nachweisbar ist. Da die zur Hemmung der Gluconeogenese in der Leber erforderlichen Biguanidkonzentrationen aus in vitro-Versuchen mit Gewebsschnitten und perfundierten Organen bekannt sind, wurde außerdem geprüft, welche Konzentrationen unter dem Einfluß derartig niedriger Dosen in der Leber und Skelettmuskulatur erreicht werden. Zum Vergleich wurden Tiere untersucht, die blutzuckersenkende Dosen von 1-Butyl-Biguanid erhielten, bei denen also mit einer sicheren Hemmung der hepatischen Glucoseneubildung zu rechnen war. Diese vergleichenden Untersuchungen wurden an Meerschweinchen durchgeführt, da diese Tiere auf Biguanide empfindlicher reagieren als Ratten.

Zu diesem Zweck wurde die Ausscheidung und Gewebsverteilung von 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C¹⁾ nach oraler Applikation von 10 mg/kg bei Ratten und Meerschweinchen sowie nach subcutaner Injektion von 20 mg/kg beim Meerschweinchen studiert. Bei den Experimenten an Ratten wurde außerdem versucht, eine Anreicherung des Biguanids in der Skelettmuskulatur autoradiographisch nachzuweisen.

¹⁾ Ich danke dem Hersteller der markierten Verbindung, Herrn Dr. P. E. Schulze, Sektion für Isotopenchemie der Schering AG, sowie Herrn Dr. Kolb, Department für Biodynamik der Schering AG, für die Überlassung der Substanz.

2.METHODIK

2.1.Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten 100 - 120 g schwere männliche Ratten (Stamm Wister, konventionell, Züchter: Firma Brünger, Bokel), sowie 250 g schwere männliche Albinomeerschweinchen (konventionell, Züchter: Firma Stock, Gellnhausen). Die Ratten erhielten Trockenfutter (Altromin R, Firma Altrogge) und als Trinkflüssigkeit Leitungswasser, die Meerschweinchen wurden mit Frischfutter (Salat, Möhren) und Trockenfutter (Altromin MS, Firma Altrogge) ernährt.

16 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren das Futter entzogen. Bei kurzdauernden Experimenten (90 und 180 Minuten) blieben sie nüchtern, hatten jedoch Zugang zur Trinkflüssigkeit. Bei Versuchen, die sich über 24 oder 48 Stunden erstreckten, wurde den Tieren 3 Stunden nach der Behandlung Futter gegeben.

2.2. Bestimmung der Verteilung und Ausscheidung von 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C bei Ratten und Meerschweinchen

2.2.1. Substanzapplikation

2.2.1.1. Versuche an Ratten

1-Butyl-Biguanid-¹⁴C wurde den Tieren in einer Dosis von 10 mg/kg, als Hydrochlorid in destilliertem Wasser gelöst, oral durch eine Schlundsonde verabfolgt. Das Lösungsvolumen betrug 0,5 ml pro 120 g Körpergewicht. Die Substanz hatte eine spezifische Aktivität von 8,33 µCi/mg, dies entspricht einer Gesamtdosis von 83,3 µCi/kg Körpergewicht.

2.2.1.2. Versuche an Meerschweinchen

Die Substanz wurde entweder in einer Dosis von 10 mg/kg ($8 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ entsprechend $80 \mu\text{Ci}/\text{kg}$ Körpergewicht) oral verabfolgt (Lösungsmittel: destilliertes Wasser) oder in einer doppelt so hohen Dosierung ($4 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ entsprechend $80 \mu\text{Ci}/\text{kg}$ Körpergewicht) in physiologischer Kochsalzlösung subcutan injiziert. Das Applikationsvolumen betrug in beiden Fällen 1 ml pro Tier.

2.2.2. Versuchsablauf

Nach der Behandlung mit dem Biguanid wurden die Tiere in Stoffwechselkäfige gesetzt, die eine getrennte Sammlung von Urin und Kot ermöglichten. Die Ratten wurden 3, 24 oder 48 Stunden, die Meerschweinchen 90 Minuten, 3 oder 24 Stunden nach der Applikation von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C in Äthernarkose durch Entbluten aus der vena cava caudalis getötet. Das Blut wurde in heparinisierten Zentrifugengläsern aufgefangen. Außer im Blut oder dem durch Zentrifugieren (3000 Upm, 10 min) gewonnenen Plasma wurde die Radioaktivität in dem bis zur Tötung ausgeschiedenen Urin und Kot, sowie in Proben folgender Organe bestimmt: Magen-Darm-Kanal, Harnblase, Herz, Skelettmuskulatur, Leber, Niere, Fettgewebe, Lunge, Nebenniere, Hoden, Haut, Milz, Pankreas und (bei Meerschweinchen) Gallenblase.

2.2.3. Aufbereitung der Gewebe

Die Gewebe wurden sofort nach der Tötung entnommen, von anhaftendem Blut befreit, gewogen und anschließend in gleicher Weise wie die gesamte Kotmenge auf Petrischalen in einer automatisch gesteuerten Gefriertrockenanlage (Firma: WKF, Typ L 5) getrocknet. Außerdem wurden je dreimal 0,5 ml Blut bzw. Plasma auf drei trichterförmig gefaltete Substanzträger aus aschefrei verbrennendem Selektar-Rundfilterpapier (3,5 cm $\varnothing$, Nr. 1507,

Schleicher-Schüll), das mit Kollodium imprägniert war, pipettiert und anschließend im Trockenschrank bei 50°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Danach wurden je dreimal 50 mg der getrockneten, mit einem Homogenisator pulverisierten Gewebe einschließlich des Kotes (bzw. der gesamte Rückstand der Harnblasen, Nebennieren und Gallenblasen) auf den gleichen Substanzträgern zusammen mit den getrockneten Blutproben verascht.

Die Verbrennung erfolgte in Erlenmeyerkolben (1000 ml, Schott G 20, NS 29/32), die mit Sauerstoff begast und mit einem modifizierten Gaswaschflaschen-Aufsatz verschlossen wurden. Das in den Kolben hineinragende Glasrohr des Aufsatzes war zugeschmolzen und trug anstelle der Filterplatte eine flache Doppelschlinge aus Palladiumdraht zur Aufnahme des Substanzträgers mit dem Zündstreifen. Am zweiten Rohr war ein 4-7 cm langer, gasdicht verschlossener Denit-Warburg-Schlauch (6x2, Deutsch-Neumann) angebracht. Zur Zündung wurde der Aufsatz mit dem unteren Pol an eine Gasflamme gebracht bis der Zündstreifen aufglühte und dann sofort fest auf den Kolben gesetzt. Nach dem Abkühlen wurde das entstandende Kohlendioxyd, das infolge der Verbrennung der in den Geweben enthaltenen Radioaktivität z.T. markiert war, durch Einleiten von methanolischem Äthanolamin gebunden. Aus versuchstechnischen Gründen wurde diese Lösung¹⁾ zusammen mit dem Scintillationsmedium¹⁾ in einem Gesamtvolumen von 20 ml mit einer Spritze durch die Schlauchwand in den geschlossenen Kolben injiziert und bis zur Absorption eine Stunde gewartet. Nach kräftigem Schütteln wurde der Aufsatz abgenommen und der Kolbeninhalt quantitativ in Plastikmeßfläschchen (Lupolen Kautex)

¹⁾ Das Gemisch bestand aus: 3000,0 ml Scintillatortoluol (12,0 g Terphenyl; 0,15 g 2,2'-p-Phenyl-bis-(5-phenyl-oxazol); Toluol ad 3000,0 ml); 1000,0 ml Äthylenglykol; 440,0 ml Äthanolamin und 800,0 ml Methanol.

überführt, in denen die Radioaktivität mit einem Flüssigkeitsscintillationsspektrometer (Modell Tricarb, Firma Packard) gemessen wurde.

Zur Bestimmung der im Urin enthaltenen Radioaktivität wurde die von den Tieren ausgeschiedene Menge mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Jeweils dreimal 0,5 ml wurden zusammen mit 20 ml eines Scintillationsmediums¹⁾, das die Bestimmung der Radioaktivität in wäßriger Lösung erlaubt, in Zählgefäße pipettiert, und anschließend wurde der darin enthaltene ¹⁴C-Gehalt mit dem gleichen Flüssigkeitsscintillationszähler bestimmt.

In beiden Scintillationslösungen wurde außerdem die Radioaktivität eines Aliquots der Lösung bestimmt, die den Tieren oral oder subcutan appliziert worden war. Unter Berücksichtigung dieses Standards, seiner spezifischen Aktivität, der veraschten Gewebs- und Kotmengen sowie deren Wassergehaltes, bzw. der eingesetzten Blut-, Plasma- und Urinvolumina wurde die Radioaktivität in den untersuchten Proben als µg 1-Butyl-Biguanid / g Feuchtwicht (FG) oder ml Blut (Plasma) errechnet. Die im Urin und Kot ausgeschiedene Radioaktivität wurde als Prozent der eingegebenen Dosis angegeben.

2.2.4. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden die arithmetischen Mittelwerte ($\bar{x}$) sowie die Standardabweichungen der Einzelwerte (s) und der Mittelwerte ($s\bar{x}$) nach folgenden Formeln errechnet:

$$1.) \quad \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

¹⁾ Das Gemisch bestand aus: 400,0 g Naphthalin; 40,0 g 2,5-Diphenyloxazol; 1,0 g 2,2'-p-Phenylene-bis-(5-phenyloxazol); Dioxan ad 4000,0 ml.

$$2.) s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \bar{x} \sum x}{n-1}}$$

$$3.) s\bar{x} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Auf den bei den Ergebnissen angeführten Tabellen sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen angegeben. Zum Nachweis signifikanter Unterschiede wurde nicht der üblicherweise verwendete t-Test benutzt, da in einigen Fällen die Streuung der zu vergleichenden Gruppen zu groß war und unter diesen Umständen eine Berechnung nach diesem Verfahren nicht erfolgen darf. Um zu vergleichbaren Resultaten zu gelangen, wurden daher bei allen Versuchen die Signifikanzen nach dem U-Test ermittelt (WEBER, 1967). Dieses Verfahren erlaubt den Vergleich von Gruppen mit unterschiedlicher Verteilung.

2.3. Bestimmung der Eiweißbindung von 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C

Die Bestimmung der Eiweißbindung von 1-Butyl-Biguanid erfolgte ebenfalls unter Verwendung radioaktiv markierter Substanz. Hierfür wurden Konzentrationen gewählt, die zuvor bei den in vivo durchgeführten Experimenten an Ratten und Meerschweinchen gemessen worden waren. Die Versuche wurden nach einer modifizierten Versuchsanordnung durchgeführt, die auf den Angaben von NEUHOFF und KIEHL (1969) basiert.

Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, daß die Einstellung eines Konzentrationsgleichgewichtes der Prüfschubstanz zwischen zwei Kammern abgewartet wird, die durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind. Die eine Kammer enthält eine eiweißfreie Pufferlösung mit der zu prüfenden Substanz, die andere Plasma der entsprechenden Tierart.

Die Dialysierkammern, die ein Volumen von je 1 ml besaßen, waren in einen runden Kunststoffblock mit zentraler Achse eingelassen. Mit der Oberfläche standen sie durch Kapillaren von 1 mm Durchmesser in Verbindung, die während der Inkubation mit Tesafilm verschlossen wurden. Die Membran, die zwar den Durchtritt niedermolekularer Substanzen erlaubte, für Eiweiß jedoch nicht permeabel war, stammte von der Firma Technicon (Ireland) LDT. (Cuprophane Membranes, Part. No. 105 - 1058).

Vor Beginn des Versuches wurde in die eine Hälfte der Doppelzellen je ein ml Meerschweinchen- oder Rattenplasma pipettiert, in die andere Hälfte je ein ml Krebs-Henseleit-Ringer-Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7,3$)¹⁾. Der Puffer enthielt 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C in einer Konzentration, die doppelt so hoch war, wie die bei den Versuchstieren in vivo zu verschiedenen Zeiten gemessenen Werte. Anschließend wurde die gesamte Zelle 24 Stunden lang bei 37° unter ständigem Rotieren (50-60 Upm) inkubiert. Eine Kontrollinkubation, bei der die Zellen auf beiden Seiten der Membran mit Puffer gefüllt wurden, hatte ergeben, daß nach Biguanidzugabe auf der einen Seite innerhalb dieses Zeitraumes ein vollständiger Konzentrationsausgleich der Substanz stattfand.

Danach wurde der ¹⁴C-Gehalt in der Puffer- und Plasmaphase mit Hilfe eines Flüssigkeitsscintillationszählers bestimmt. Hierzu wurden 0,1 ml der verschiedenen Medien in Zählgefäße pipettiert, die bereits 1 ml Soluene TM 100 (Firma Packard, Catalog. No. 6003021) enthielten. Diese Flüssigkeit diente dazu, das im Plasma enthaltene Eiweiß aufzulösen und seine Ausfällung durch die anschließende Zugabe des toluolhaltigen Scintillators (Zusammensetzung s. S. 13) zu verhindern.

1) Zusammensetzung: 76 ml Stammlösung I und 14 ml Stammlösung II.
Stammlösung I: 0.154 M NaCl, 0.154 M KCl, 0.154 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0.110 M CaCl_2 ; Stammlösung II: 17.805 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (= 0.1 Mol),
20 ml 1N HCl, aqua bidest. ad 1000.0 ml.

Unter Berücksichtigung der Zählausbeute, die mit einem internen Standard ermittelt wurde, konnte der ^{14}C -Gehalt in der Puffer- und Plasmaphase in der Dimension dpm/ml errechnet und daraus die prozentuale Verteilung der Aktivität auf beide Medien ermittelt werden. Die Differenz zwischen Plasma und Puffer wurde auf die Bindung an Serumproteine zurückgeführt und als Prozent-Eiweißbindung angegeben.

2.4. Schätzung der extra- und intrazellulären Konzentration der Radioaktivität in der Leber und Skelettmuskulatur von Ratten und Meerschweinchen nach Behandlung mit 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C

Außer einer Kenntnis der Eiweißbindung ist zur Berechnung der intrazellulären Konzentration einer Verbindung aus dem im Gewebe und Plasma gemessenen Gehalt die Größe des extrazellulären Flüssigkeitsraumes (EZF) erforderlich. Da eine individuelle Bestimmung des EZF, die üblicherweise mit ^{14}C -Inulin oder ^{14}C -Saccharose erfolgt, aus versuchs- und meßtechnischen Gründen bei den vorliegenden Untersuchungen nicht möglich war, wurde lediglich die intrazelluläre Konzentration des Biguanids unter Berücksichtigung der aus der Literatur bekannten Daten geschätzt.

Angaben über den Extrazellulärraum der Skelettmuskulatur und der Leber von Ratten wurden einer Arbeit von LOSERT, SENFT und SENFT (1964) entnommen. Entsprechende Daten über Meerschweinchen liegen nicht vor. Da bei der Trockengewichtsbestimmung (s. S. 11) der Wassergehalt der Leber und Skelettmuskulatur beim Meerschweinchen sich nicht wesentlich von den bei Ratten gemessenen Werten unterschied, wurden auch bei dieser Tierart für eine Schätzung der intrazellulären Konzentrationen die von den zitierten Autoren ermittelten extrazellulären Flüssigkeitsvolumina zugrunde gelegt. Die Berechnung erfolgte aus den Mittelwerten des innerhalb eines Versuches gemessenen Wassergehaltes der betreffenden Organe und der zugleich bestimmten 1-Butyl-Biguanid-Konzentration.

nen im Plasma (Blut)¹⁾ und Gewebe, der Eiweißbindung, die in vitro ermittelt wurde, und dem von LOSERT, SENFT und SENFT (1964) angegebenen EZF in der Leber und Skelettmuskulatur nach folgenden Formeln:

$$1.) \text{ EB} = \text{Plasma-Konz.} - \frac{\text{Plasma-Konz.} \cdot \% \text{ Eiweißbindung}}{100}$$

$$2.) \text{ IB} = \frac{\text{GB} - (\text{EZF} \cdot \text{EB})}{\text{GW} - \text{EZF}}$$

Darin bedeuten:

EB = extrazelluläre Biguanid-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$ EZF)

EZF = extrazellulärer Flüssigkeitsraum (ml/g FG)

IB = intrazelluläre Biguanid-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$ IZF)

IZF = intrazellulärer Flüssigkeitsraum (ml/g FG)

GB = Gesamtbiguanidgehalt des Gewebes ($\mu\text{g/g}$ FG)

FG = Feuchtgewicht

GW = Gesamtwassergehalt des Gewebes (ml/g FG)

Plasmakonzentration in $\mu\text{g/ml}$

Aus dem Quotienten zwischen den auf diese Weise geschätzten intra- und extrazellulären Konzentrationen, die außerdem auch in der Dimension $\mu\text{mol/l}$ angegeben werden, können Rückschlüsse auf die Anreicherung in den betreffenden Geweben gezogen werden.

2.5. Autoradiographische Untersuchungen an Ratten nach Behandlung mit 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C

2.5.1. Ganztierautoradiographie

Diese Versuche wurden an Ratten durchgeführt. Die Tiere erhielten das radioaktive 1-Butyl-Biguanid in einer Dosis von 10 mg/kg (entsprechend 20,51 $\mu\text{Ci/kg}$; spezifische Aktivität 2,051 $\mu\text{Ci/mg}$) oral verabreicht.

1) Vorversuche, die im Einzelnen im Ergebnisteil dargestellt werden, zeigen, daß die Konzentration der Radioaktivität im Plasma und Blut keinerlei Unterschiede aufweist.

Nach 30 Minuten sowie nach 1 ,4 ,8 und 24 Stunden wurde je ein Tier getötet und zur Autoradiographie präpariert. Hierzu wurde das Fell geschoren und nach Entfernung der Schneidezähne der Kadaver auf einem Mikrotomblock in Schabefleisch eingebettet. Nach Kältefixierung in einem Methanol-Trockeneis-Gemisch wurde in einem Kyrostaten (Modell Dittes Heidelberg) bei -30°C Schicht um Schicht abgetragen bis das Colon descendens und das Rectum in der Schnittebene lagen. Etwa jeder Zehnte der nun folgenden Schnitte von 25μ Schichtdicke wurde nach der Methode von ULLBERG (1958) mit Tesafilm aufgenommen und 24 Stunden bei -34°C getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte unter leichtem Druck auf Osray-Agfa-Filme aufgelegt und in lichtdichten Kästen bei -28° bis -32°C exponiert. Die Expositionszeit betrug 22 Tage. Anschließend erfolgte die Entwicklung mit Gevaert G 150 - Entwickler.

Den markierten Präparaten wurden zum Ausschluß von Artefaktbildungen Kontrollpräparate einer unbehandelten Ratte, die parallel unter den gleichen Versuchsbedingungen hergestellt wurden, gegenübergestellt.

2.5.2. Mikroautoradiographische Untersuchungen der Skelettmuskulatur

Die Versuche wurden an zwei Ratten mit einem Gewicht von 110 g durchgeführt. Um den Tieren eine ausreichend hohe Radioaktivitätsmenge zu zuführen, mußte die 1-Butyl-Biguaniddosis gegenüber den bisher beschriebenen Versuchsanordnungen gesteigert werden. Den Ratten wurden 10 mg (= $339\mu\text{Ci}$) bzw. 8,9 mg (= $300\mu\text{Ci}$) 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C als Hydrochlorid (spezifische Aktivität: $33,9\mu\text{Ci/mg}$) in einem ml Wasser per os verabreicht. Dies entspricht einer Dosis von 80-90 mg/kg (= $3,05\text{ mCi/kg}$). Wie die Untersuchungen von KRAAZ (1971) gezeigt haben, führen diese Dosen noch nicht zu einer Erniedrigung der Glucosekonzentration im Blut und liegen damit unterhalb des

toxischen Bereiches. Als Kontrolltier diente eine un-behandelte Ratte.

Nach 24 Stunden wurden die Tiere mit Äther getötet und Proben der Oberschenkel- und Nackenmuskulatur entnommen. Ein Teil wurde sofort durch Besprühen mit Frigen (Chlortrifluormethan) und anschließender Lagerung in flüssigen Stickstoff eingefroren, ein anderer Teil in Bouin'scher Lösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Aus den gefrorenen Gewebeproben wurden mit einem Kyrostaten (Kyrotom: WK 1150; Mikrotom: Jung, Typ Minot) 10 μ dicke Schnitte hergestellt, die in Anlehnung an das Verfahren von STUMPF und ROTH (1967) gefriergetrocknet wurden. Aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden ebenfalls in üblicher Weise 10 μ dicke Schnitte hergestellt.

Die Autoradiographie der Präparate erfolgte nach der Methode von STUMPF und ROTH (1966). Die Schnitte wurden auf Kodak AR 10 Stripping Film aufgelegt. Die Expositionsdauer betrug bei den in Paraffin eingebetteten Proben vier Monate, bei den Kyrostatschnitten acht Wochen. Danach wurden die Filme entwickelt (Kodak D 19, Entwicklungszeit 5 Minuten) und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die fertigen Präparate wurden bei einer Vergrößerung von 1:1500 auf Agfa-Gevaert-Film (45 C 62, schwarz-weiß) fotografiert, wobei die Bildschärfe entweder auf die Filmebene oder die Schnittebene eingestellt wurde.

3. ERGEBNISSE

3.1. Verteilung und Ausscheidung von 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C bei Ratten

3.1.1. Ausscheidung

Bis zur 3. Stunde schieden Ratten, die mit 10 mg/kg 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C behandelt wurden 44,5 % der applizierten Aktivität mit dem Urin und 0,6 % mit dem Kot aus.

Bis zur 24. Stunde war die Ausscheidung über die Nieren auf 76 % der Eingabe angestiegen, die Gesamtausscheidung betrug zu diesem Zeitpunkt 85 %. Im Laufe des folgenden Tages wurde nicht mehr Radioaktivität über Urin und Kot eliminiert. 15 bis 20 % der applizierten Dosis müssen demnach zu dieser Zeit noch im Organismus verblieben sein (Tabelle 1).

AUSSCHIEDUNG der RADIOAKTIVITÄT im Urin und Kot von RATTEN nach oraler Applikation von 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C (10 mg/kg; 83,3 µCi/kg).

$\bar{x} \pm s\bar{x}$; Signifikanz: - : $p > 0,05$; ++ : $p < 0,02$

	AUSSCHIEDUNG (in % der Eingabe)		
	bis zur 3.Std n = 5	bis zur 24.Std n = 6	bis zur 48.Std n = 5
URIN	44,5 $\pm$ 3,8 ++	75,6 $\pm$ 3,5	65,7 $\pm$ 6,9 -
KOT	0,6 $\pm$ 0,5 ++	9,6 $\pm$ 3,9	12,9 $\pm$ 4,1 -
GESAMT- AUSSCHIEDUNG	45,1 $\pm$ 3,7 ++	85,2 $\pm$ 1,6	78,6 $\pm$ 4,7 -

TABELLE 1

3.1.2. Verteilung in verschiedenen Geweben

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind auf der Tabelle 2 und der Abbildung 1 dargestellt.

3 Stunden nach Behandlung mit 10 mg/kg der Substanz betrug die Konzentration der Radioaktivität im Blut (ausgedrückt als Butyl-Biguanid) 0,9 µg/ml. In allen untersuchten Geweben mit Ausnahme der Milz und des Fettgewebes, d.h. im Magen-Darm-Trakt, in der Harnblase, in der Herz- und Skelettmuskulatur, in der Leber und Niere, in der Lunge, den Nebennieren, den Hoden und der Haut wurden höhere Konzentrationen gemessen. Der höchste Gehalt war mit 13 µg/g FG im Magen-Darm-Kanal und mit 41 µg/g FG in der Harnblase nachweisbar. Die Konzentrationen in der Lunge, den Nebennieren, der Leber, den Nieren und der Herzmuskulatur lagen zwischen 3,4 und 6,5 µg/g FG. In den übrigen Geweben betrug die Konzentration zwischen 1,1 und 2,1 µg/g FG.

Nach 24 Stunden hatte die Radioaktivität im Blut stark abgenommen, sie lag nur noch bei 0,04 µg/ml. Auch in allen anderen untersuchten Geweben wurden niedrigere Werte als nach 3 Stunden festgestellt, sie übertrafen jedoch in allen Fällen die im Blut gemessene Konzentration. Das Ausmaß der Radioaktivitätsabnahme war in den einzelnen Organen unterschiedlich. Während in der Skelettmuskulatur die Konzentration nur auf etwas weniger als die Hälfte des 3 Stunden-Wertes abgesunken war, hatte sie im Magen-Darm-Kanal und der Harnblase, sowie der Herzmuskulatur, der Leber, den Nieren und den übrigen untersuchten Geweben erheblich stärker abgenommen. Die Skelettmuskulatur unterschied sich damit eindeutig von allen anderen Organen.

Die gleiche Aussage erlauben die nach 48 Stunden beobachteten Veränderungen. Geringfügig höhere Konzentrationen als in der Muskulatur wurden zu diesem Zeitpunkt nur im Magen-Darm-Trakt festgestellt. In den übrigen Geweben wurden erheblich niedrigere Werte ermittelt, der

Verteilung der RADIOAKTIVITÄT¹⁾ IM ORGANISMUS der RATTE²⁾
zu verschiedenen Zeiten nach oraler Gabe von 10 mg/kg
(= 83,3 µCi/kg) 1-BUTYL-BIGUANID-¹⁴C.

(¹⁾errechnet als µg 1-BUTYL-BIGUANID/g Feuchtgewicht oder
ml Blut; (²⁾Applikation nach 16-stündigem Futterentzug)

$\bar{x} \pm s\bar{x}$; Signifikanz: - : $p > 0,05$; + : $p < 0,05$; ++ : $p < 0,02$

	µg 1-BUTYL-BIGUANID/g FG (ml BLUT)		
GEWEBE	nach 3 Std n=5	nach 24 Std n=6	nach 48 Std n=5
BLUT	0,893 ± 0,079	0,042 ± 0,007	0,016 ± 0,001
MAGEN-DARM-KANAL signifikant > Blut	13,424 ± 7,496 ++	1,016 ± 0,208 ++	0,429 ± 0,167 ++
HARNBLASE signifikant > Blut	40,838 ± 24,982 ++	0,541 ± 0,147 ++	0,086 ± 0,018 ++
HERZ signifikant > Blut	4,957 ± 0,456 ++	0,236 ± 0,023 ++	0,051 ± 0,012 ++
SKELETTMUSKULATUR signifikant > Blut	2,086 ± 0,132 ++	0,935 ± 0,150 ++	0,238 ± 0,056 ++
LEBER signifikant > Blut	4,656 ± 0,595 ++	0,298 ± 0,051 ++	0,042 ± 0,005 ++
NIERE signifikant > Blut	6,475 ± 0,982 ++	0,425 ± 0,062 ++	0,042 ± 0,005 ++
FETTGeweBE signifikant > Blut	0,626 ± 0,109 -	0,152 ± 0,024 ++	0,059 ± 0,018 ++
LUNGE signifikant > Blut	3,433 ± 0,795 ++	0,253 ± 0,032 ++	0,032 ± 0,003 ++
NEBENNIEREN signifikant > Blut	3,701 ± 0,799 ++	0,855 ± 0,134 ++	0,063 ± 0,004 ++
HODEN signifikant > Blut	1,501 ± 0,151 -	0,349 ± 0,156 ++	0,018 ± 0,002 -
HAUT signifikant > Blut	1,621 ± 0,205 ++	0,370 ± 0,044 ++	0,146 ± 0,024 ++
MILZ signifikant > Blut	1,121 ± 0,202 -	0,273 ± 0,037 ++	0,025 ± 0,004 +
PANKREAS signifikant > Blut	2,088 ± 0,130 ++	0,436 ± 0,156 ++	0,032 ± 0,004 ++

TABELLE 2

Verteilung der Radioaktivität¹
im Organismus der Ratte
nach einer Behandlung mit 1-Butyl-Biguanid (^{14}C)²
(But.-Big.)
(¹errechnet als $\mu\text{g But.-Big./g FG}$ oder ml Blut ,
² 10 mg/kg [$\approx 83,3 \mu\text{Ci/kg}$])

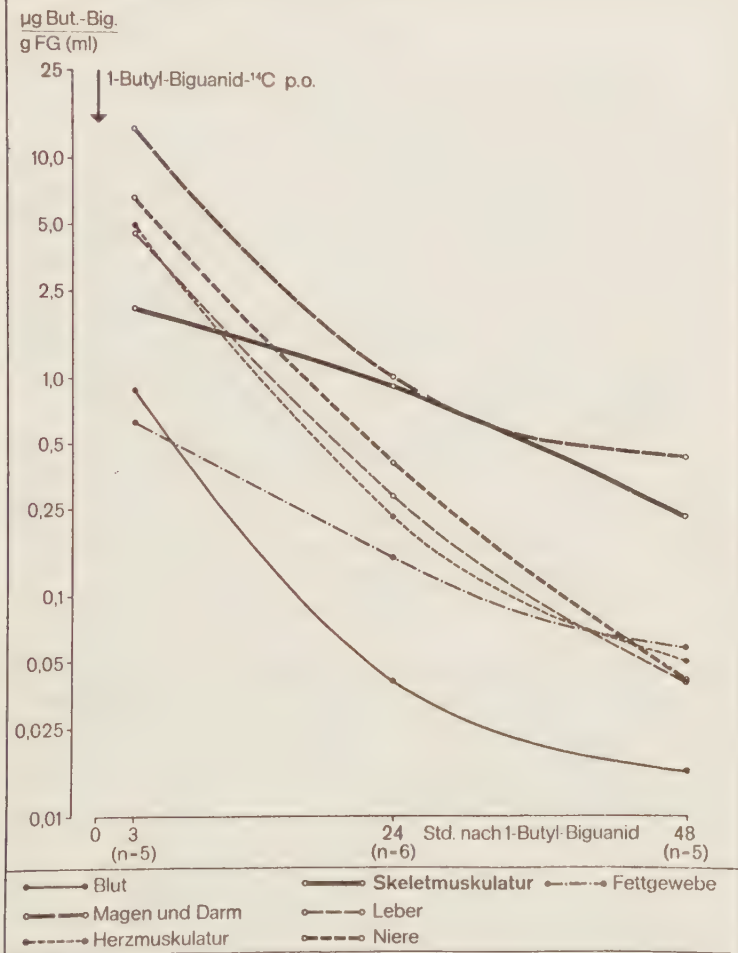


Abbildung 1

Gehalt an Radioaktivität im Blut betrug nur noch
 0,016 $\mu\text{g/ml}$.

3.1.3. Vergleich der Radioaktivität im Blut und im Plasma
 Bei den unter 3.1.2. dargestellten Ergebnissen war lediglich der Gehalt der Radioaktivität in verschiedenen Geweben der Konzentration im Blut gegenübergestellt worden.

Um zu exakteren Aussagen über eine unterschiedliche Anreicherung in einzelnen Organen zu gelangen, ist es von Nutzen, das Verhältnis zwischen intra- und extrazellulärer Konzentration zu wissen. Hierfür ist die Kenntnis der Plasmakonzentration wesentlich. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht bestand jedoch weder nach 3, noch nach 24 oder 48 Stunden im Radioaktivitätsgehalt zwischen Plasma und Blut ein Unterschied.

Für die approximative Berechnung der intrazellulären Konzentrationen in der Leber und Skelettmuskulatur, d.h. den Organen, die in erster Linie für die Gluconeogenese bzw. Glucoseutilisation verantwortlich sind, wurden daher die im Blut gemessenen Konzentrationen verwendet.

Vergleich der RADIOAKTIVITÄT¹⁾ im BLUT und im PLASMA von RATTEN nach oraler Gabe von 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C (10 mg/kg; 83,3 $\mu\text{Ci/kg}$).

$[\bar{x} \pm s\bar{x}$; Signifikanz: - : $p > 0,05$; ¹⁾errechnet als μg 1-Butyl-Biguanid/ml Blut oder Plasma

	μg 1-BUTYL-BIGUANID/ml		
	nach 3 Std n = 6	nach 24 Std n = 5	nach 48 Std n = 4
BLUT	0,748 $\pm$ 0,057	0,022 $\pm$ 0,005	0,017 $\pm$ 0,009
Signifikanz	-	-	-
PLASMA	0,774 $\pm$ 0,041	0,021 $\pm$ 0,004	0,018 $\pm$ 0,008

TABELLE 3

3.1.4. Eiweißbindung von 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C im Plasma

Da nur der nicht an Plasmaproteine gebundene Anteil des Biguanids durch die Gefäßwände in den interstiellen Flüssigkeitsraum und anschließend durch die Zellmembranen in den intrazellulären Raum der Gewebe gelangen kann, wurde die Eiweißbindung der Substanz im Rattenplasma bestimmt. Die Untersuchungen wurden mit Biguanidkonzentrationen in Größenordnungen durchgeführt, wie sie nach 3, 24 und 48 Stunden im Blut von Ratten nach Behandlung mit 10 mg/kg festgestellt worden waren.

Die Resultate von Experimenten mit der niedrigsten Konzentration (0,02 µg/ml) ließen sich nicht auswerten, da die gemessene Radioaktivität nur gering über dem Leerwert lag. Bei den beiden übrigen Konzentrationen (0,04 µg/ml und 1 µg/ml) wurde eine nahezu gleiche Eiweißbindung von im Mittel 24,6 % gemessen (Tabelle 4).

EIWEIßBINDUNG von 1-BUTYL-BIGUANID-¹⁴C im PLASMA von RATTEN.

(Jeder Wert ist das Mittel aus 2 Bestimmungen mit dem Plasma verschiedener Tiere.)

PLASMAKONZENTRATION (µg/ml)	EIWEIßBINDUNG (in % der Plasmakonzentration)
0,04	23,99
1,00	25,16
	$\bar{x} = 24,58$ $s\bar{x} = 0,59$

TABELLE 4

3.1.5. Schätzung der intrazellulären Radioaktivitätskonzentrationen in der Leber und Skelettmuskulatur

Unter Berücksichtigung einer Eiweißbindung von 24,58% eines Gesamtwassergehaltes der Leber von 72,46 % und eines extrazellulären Flüssigkeitsvolumens von 16,98 % wurde aus den in Tabelle 1 angegebenen Mittelwerten die intra- und extrazelluläre Konzentration der Radioaktivität in der Leber geschätzt. Für die Berechnung der Konzentrationen in der Skelettmuskulatur wurden folgende Daten zugrunde gelegt: ein Gesamtwassergehalt von 72,28 % und ein Extrazellulärraum von 12,48 % .

Die Ergebnisse sind auf Tabelle 5 und der Abbildung 2 dargestellt. Danach lag die intrazelluläre Konzentration in der Leber 3 Stunden nach Behandlung mit 10 mg/kg 1-Butyl-Biguanid bei 8,2 µg/ml ($= 42,3 \cdot 10^{-6} \text{M}$). Als extrazelluläre Konzentration wurde ein Wert von etwa 0,7 µg/ml ($= 3,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$) ermittelt. Dies bedeutet, daß innerhalb der Zelle die Aktivität rund zwölfmal höher lag als außerhalb. Nach 24 Stunden hatten sowohl die intra- wie die extrazelluläre Konzentration um etwa den gleichen Betrag abgenommen. Für den Intrazellulärraum wurde ein Gehalt von 0,5 µg/ml ($= 2,7 \cdot 10^{-6} \text{M}$), für den Extrazellulärraum eine Konzentration von 0,03 µg/ml ($= 0,17 \cdot 10^{-6} \text{M}$) errechnet. Der Konzentrationsquotient betrug 16,5. Nach weiteren 24 Stunden war er auf 6 abgesunken, da innerhalb dieses Zeitraumes die extrazelluläre Aktivität auf etwa ein Drittel des 24-Stunden-Wertes abgesunken war, der intrazelluläre Gehalt jedoch um mehr als 85 % abgenommen hatte.

Demgegenüber nahm der Konzentrationsunterschied zwischen intra- und extrazellulärem Raum der Skelettmuskulatur während der Beobachtungsperiode stark zu. Während nach 3 Stunden der Gehalt an Radioaktivität innerhalb der Zellen mit 3,3 µg/ml ($= 17,3 \cdot 10^{-6} \text{M}$) nur fünfmal höher lag als in der Extrazellulärflüssigkeit, stieg der Konzentrationsunterschied bis zur 24. Stunde nach Applikation der

Konzentration der RADIOAKTIVITÄT¹⁾ im intra- und extrazellulären Flüssigkeitsraum (IZF, EZF) der LEBER und SKELETMUSKULATUR von RATTEN nach Behandlung mit 10 mg/kg (p.o.) 1-BUTYL-BIGUANID-¹⁴C.

1) Errechnet als µg/ml IZF und EZF aus den Mittelwerten der Gewebs- und Blut(Plasma)konzentrationen.

Folgende Daten wurden hierfür verwendet ($\bar{x} \pm s\bar{x}$):

- (1) Eiweißbindung : $24,58 \pm 0,59 \%$
- (2) Gesamtwassergehalt der Leber : $72,46 \pm 0,35 \%$
Gesamtwassergehalt der Muskulatur : $72,28 \pm 0,44 \%$
(Ermittlung der Werte an den mit dem Biguanid behandelten Tieren.)
- (3) Extrazellulärraum der Leber : $16,98 \pm 0,82 \%$
Extrazellulärraum der Muskulatur : $12,48 \pm 0,43 \%$
(nach LOSERT, SENFT und SENFT, 1964)

	nach 3 Std		nach 24 Std		nach 48 Std	
	µg/ml	$\times 10^{-6}$	µg/ml	$\times 10^{-6}$	µg/ml	$\times 10^{-6}$

LEBER

IZF	8,186	42,3	0,527	2,7	0,072	0,37
EZF	0,674	3,5	0,032	0,17	0,012	0,06
$\frac{IZF}{EZF}$	12,1		16,5		6,0	

SKELETMUSKULATUR

IZF	3,348	17,3	1,557	8,0	0,395	2,0
EZF	0,674	3,5	0,032	0,17	0,012	0,06
$\frac{IZF}{EZF}$	5,0		48,7		32,9	

TABELLE 5

Konzentration der **Radioaktivität¹**
im intra- und extrazellulären Flüssigkeitsraum
(IZF, EZF) der **Skelettmuskulatur** von **Ratten**
nach oraler Gabe von 10 mg/kg (=83,3 µCi/kg)
1-Butyl-Biguanid-¹⁴C (But.-Big.)

(¹errechnet als µg (nmol) 1-Butyl-Biguanid/ml
IZF und EZF aus den Mittelwerten der Gewebs-
und Plasma(Blut)konzentration unter Berücksichtigung
einer Eiweißbindung von 24,58%, eines Gesamt-
wassergehaltes von 72,28% und eines Extrazellulär-
raumes von 12,48%; *nach LOSERT,
SENFT und SENFT, 1964)

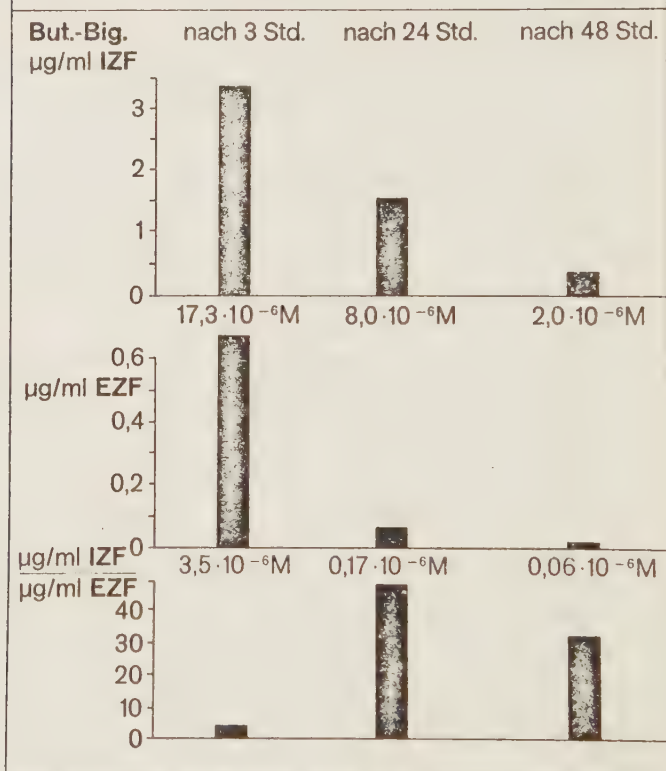


Abbildung 2

Substanz fast auf das Zehnfache an. Zu diesem Zeitpunkt lag die intrazelluläre Konzentration ungefähr bei $1,6 \mu\text{g/ml}$ ($= 8 \cdot 10^{-6} \text{M}$). Nach 48 Stunden hatte zwar die intrazelluläre Aktivität etwas stärker abgenommen als zwischen der 3. und 24. Stunde, lag jedoch noch mehr als dreißigmal höher als die Konzentration, die für den Extrazellulärraum ermittelt wurde.

Diese Befunde sprechen dafür, daß bei Ratten die Radioaktivität nach Applikation von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C selektiv in der Skelettmuskulatur angereichert wird.

3.1.6. Autoradiographische Untersuchungen

3.1.6.1. Ganztierautoradiographie

Die erste Untersuchung wurde 30 Minuten nach Applikation des radioaktiven Biguanids vorgenommen. Nach der autoradiographischen Schwärzungsintensität zeigte sich in absteigender Reihenfolge folgendes Bild: Magen und Duodenum waren stark geschwärzt, Niere und Leber zeigten ebenfalls eine ausgeprägte Schwärzung. Die Speicheldrüsen waren gut dargestellt, die Wände der Blutgefäße waren deutlich erkennbar. Die Schwärzung der Herz- und Skelettmuskulatur war nur gering ausgeprägt (Abbildung 3 und 4).

Nach einer weiteren halben Stunde hatte sich das Bild nur geringfügig geändert. Die Darmschleimhaut war zu diesem Zeitpunkt deutlich markiert (Abbildung 5 und 6).

Nach 4 Stunden fiel auf, daß von den abdominalen Organen im Wesentlichen nur noch die Niere, insbesondere das Nierenbecken, stark geschwärzt war, während die Aktivität in der Leber deutlich abgenommen hatte. Auch die Speicheldrüsen stellten sich schwächer dar als nach 30 Minuten und einer Stunde. Sowohl die Leber als auch die Speicheldrüsen waren nicht wesentlich deutlicher er-



Abbildung 3: Ganztierautoradiographie der Ratte, 30 Minuten nach Gabe von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C .



Abbildung 4: Ganztierautoradiographie der Ratte, 30 Minuten nach Gabe von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C .

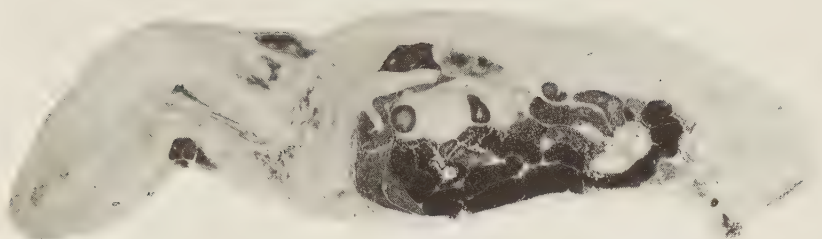


Abbildung 5: Ganztierautoradiographie der Ratte, 1 Stunde nach Gabe von 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C.

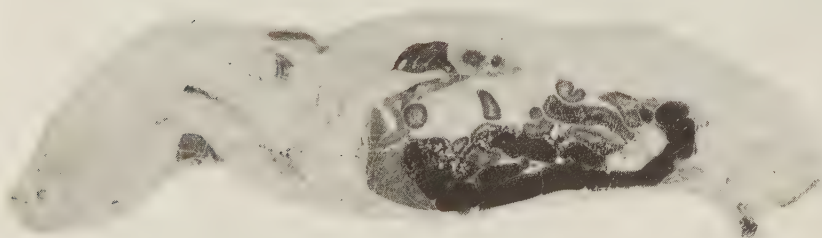


Abbildung 6: Ganztierautoradiographie der Ratte, 1 Stunde nach Gabe von 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C.

kennbar als die Herz- und im geringeren Maße die Skelettmuskulatur (Abbildung 7 und 8).

Nach 8 Stunden nahm die Radioaktivität im oberen Teil des Magen-Darm-Traktes weiter ab (Abbildung 9), nach 24 Stunden waren Magen und Duodenum frei von radioaktiver Kontamination, dagegen stellte sich die quergestreifte Muskulatur im gesamten Organismus deutlich dar (Abbildung 10 und 11).

Diese Resultate bestätigen den bei der Bestimmung der Radioaktivität in den einzelnen Geweben erhobenen Befund, daß nach Applikation von markiertem 1-Butyl-Biguanid in der Skelettmuskulatur eine deutliche Anreicherung von ^{14}C nachweisbar ist.

Zur Frage nach der Lokalisation der Aktivität in diesem Gewebe wurden anschließend mikroautoradiographische Untersuchungen durchgeführt.

3.1.6.2. Mikroautoradiographie der Skelettmuskulatur

Die Auswertung der 24 Stunden nach Behandlung mit 90 mg/kg 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C entnommenen Gewebeproben der Oberschenkel- und Nackenmuskulatur ergab im Vergleich zu einem unbehandelten Tier folgendes Bild:

Während bei der Kontrolle nur vereinzelte schwarze Punkte auf der Mikroautoradiographie erkennbar waren (Abbildung 12), zeigten Schnitte der behandelten Tiere eine erheblich dichtere Schwärzung (Abbildung 13). Sie war fast ausschließlich im Bereich der Muskelfasern nachzuweisen und zeigte eine deutliche Abgrenzung gegenüber dem gefäßführenden Binde- und Fettgewebe (Abbildung 14, 15 und 16). Die leichte Unschärfe der dargestellten zellulären Struk-

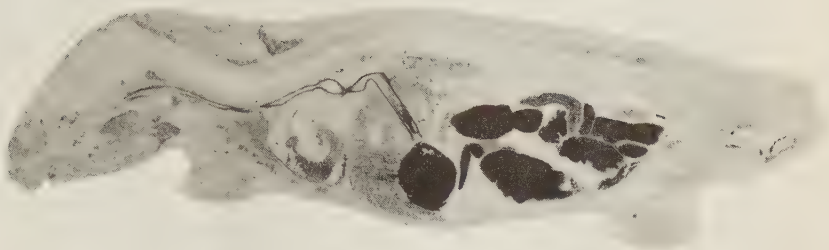


Abbildung 7: Ganztierautoradiographie der Ratte, 4 Stunden nach Gabe von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C .



Abbildung 8: Ganztierautoradiographie der Ratte, 4 Stunden nach Gabe von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C .



Abbildung 9: Ganztierautoradiographie der Ratte, 8 Stunden nach Gabe von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C .

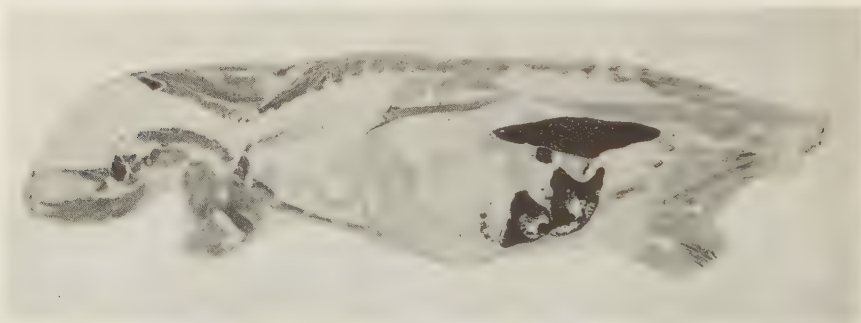


Abbildung 10: Ganztierautoradiographie der Ratte, 24 Stunden nach Gabe von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C .



Abbildung 11: Ganztierautoradiographie der Ratte, 24 Stunden nach Gabe von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C .

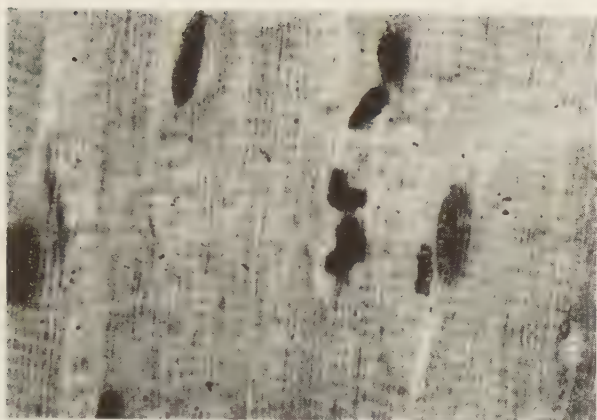


Abbildung 12: Mikroautoradiographie der Muskulatur einer unbehandelten Ratte. Längsschnitt (Paraffin), 1:1500.

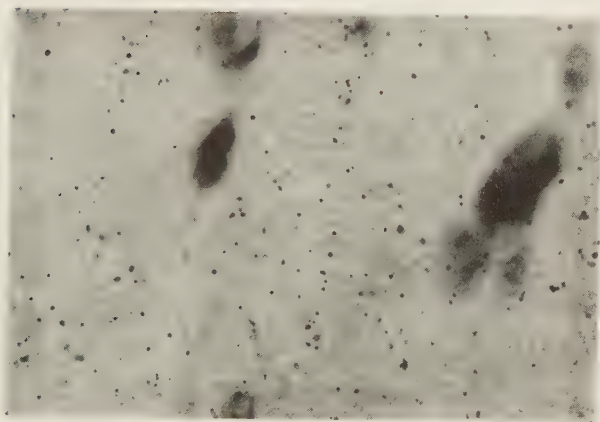


Abbildung 13: Mikroautoradiographie der Oberschenkelmuskulatur einer Ratte, 24 Stunden nach Gabe von 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C. Längsschnitt (Paraffin), 1:1500.

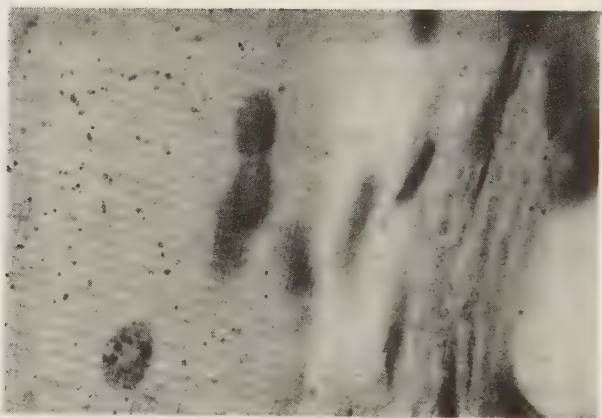


Abbildung 14: Mikroautoradiographie der Oberschenkel-
muskulatur einer Ratte, 24 Stunden nach
Gabe von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C . Muskelfa-
sern mit rechts daneben liegendem Fett-
gewebe. Längsschnitt (Paraffin), 1:1500.

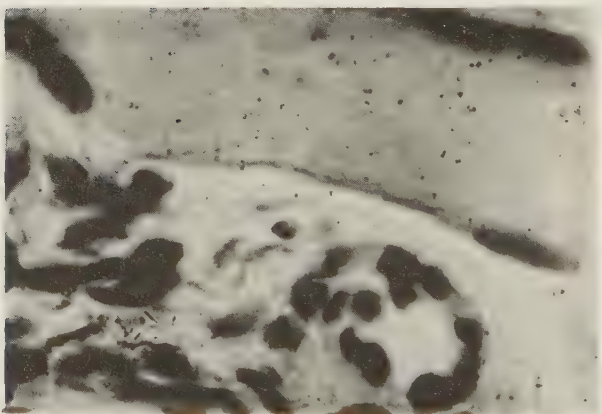


Abbildung 15: Mikroautoradiographie der Nackenmuskulatur
einer Ratte, 24 Stunden nach Gabe von 1-
Butyl-Biguanid- ^{14}C . Muskelfasern mit an-
grenzendem gefäßführenden Bindegewebe.
Längsschnitt (Kyrostatschnitt), 1:1500.

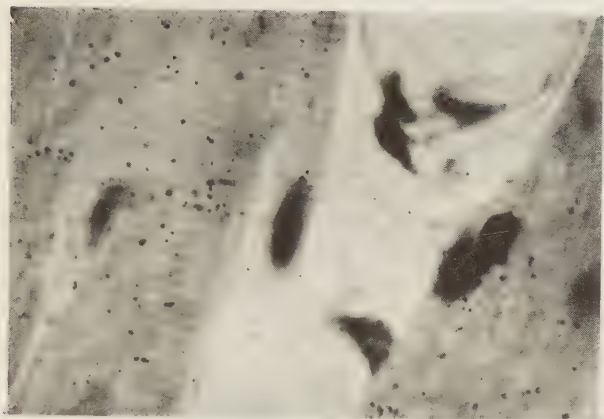


Abbildung 16: Mikroautoradiographie der Nackenmuskulatur einer Ratte, 24 Stunden nach Gabe von 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C. Muskelfasern mit dazwischenliegendem gefäßführenden Bindegewebe. Längsschnitt (Kyrostatschnitt), 1:1500.

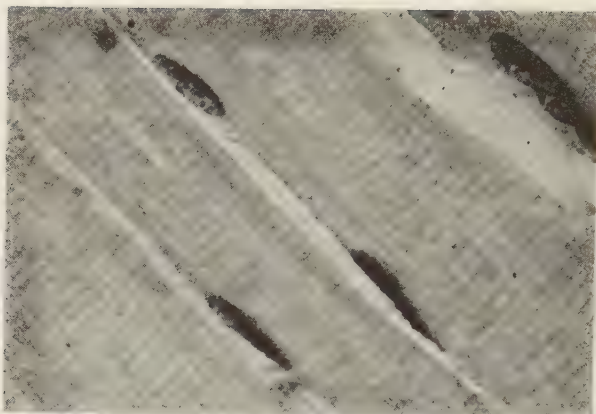


Abbildung 17: Mikroautoradiographie der Oberschenkelmuskulatur einer Ratte, 24 Stunden nach Gabe von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C . Längsschnitt (Paraffin), 1:1500. Scharfeinstellung auf die Autoradiographie.



Abbildung 18: Dasselbe Präparat wie Abbildung 17. Einstellung der Bildscharfe auf die Schnittebene.

turen erklärt sich dadurch, daß bei der Aufnahme dieser Bilder die Schärfe auf den unter den histologischen Schnitt befindlichen Film eingestellt wurde. Dies geht aus einem Vergleich zwischen Abbildung 17 und 18 hervor, bei denen die Optik einmal auf die Autoradiographie und zum anderen auf die Schnittebene justiert wurde.

Auffällig ist die Tatsache, daß die Radioaktivität in gleicher Weise sowohl in den Kryostat- wie in den Paraffinschnitten nachweisbar war. Daß bei der Aufarbeitung der Paraffinschnitte (Fixierung, Entwässerung) die an sich wasserlösliche radioaktive Verbindung offenbar nicht herausgewaschen wurde, spricht dafür, daß die Radioaktivität auf irgendeine Weise an eine zelluläre Struktur gebunden wurde.

Eine Aussage über die Lokalisation in der Muskelzelle kann aufgrund der vorliegenden Bilder nicht erfolgen. Auf einigen Abbildungen hat man jedoch den Eindruck, als ob die punktförmigen Schwärzungen vorwiegend über dem Grenzbereich zwischen dem A- und I-Band angeordnet sind. Da in diesem Bereich Invaginationen der Zellmembran in die Tiefe bis an die Myofibrillen heranreichen (WOLFF, 1967), wäre diese Lokalisation mit der Annahme einer Bindung der Radioaktivität an die Membran vereinbar.

3.2. Verteilung und Ausscheidung von 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C bei Meerschweinchen

In der Einleitung wurde bereits darauf hingewiesen, daß Versuche bei dieser Tierart mit zwei verschiedenen Dosen und unterschiedlicher Applikationsart durchgeführt wurden. In einer Versuchsreihe wurde die Verteilung und Ausscheidung 90 und 180 Minuten nach subcutaner Injektion von 20 mg/kg 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C untersucht, d.h. zu einer Zeit, in der diese Dosis eine starke Erniedrigung der Glucosekonzentration im Blut bewirkt. Diesen Experimenten wurde ein Versuch gegenübergestellt, der 24 Stunden nach oraler Gabe einer nicht blutzuckersenkenden Dosis von 10 mg/kg durchgeführt wurde. Hierbei interessierte vor allem, ob beim Meerschweinchen ebenso wie bei der Ratte eine Anreicherung der Substanz in der Skelettmuskulatur nachweisbar ist.

3.2.1. Ausscheidung

Bis zur 90. Minute nach Injektion von 20 mg/kg 1-Butyl-Biguanid wurden 8,6 % , bis zur 180. Minute 11,2 % der applizierten Aktivität mit dem Urin ausgeschieden. Eine Ausscheidung mit dem Kot war während dieses kurzen Zeitraumes noch nicht nachweisbar (Tabelle 6).

24 Stunden nach oraler Gabe der niedrigeren Dosis hatten die Meerschweinchen 69 % der Eingabe ausgeschieden. Der größte Teil (65,5 %) wurde mit dem Urin, die Differenz mit dem Kot eliminiert. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich demnach noch etwas mehr als 30 % der applizierten Radioaktivität im Organismus der Tiere (Tabelle 6).

AUSSCHEIDUNG der RADIOAKTIVITÄT im Urin und Kot von MEERSCHWEINCHEN nach Applikation von 1-BUTYL-BIGUANID-¹⁴C (20 oder 10 mg/kg; 80 µCi/kg).

$\bar{x} \pm s\bar{x}$; Signifikanz: - : $p > 0,05$

	AUSSCHEIDUNG (in % der Eingabe)		
	nach s.c. Injektion von 20 mg/kg		nach oraler Gabe von 10 mg/kg
	bis zur 90.Min n=5	bis zur 180.Min n=5	bis zur 24.Std n=3
URIN	8,6 $\pm$ 8,6	11,2 $\pm$ 8,9	65,5 $\pm$ 2,5
KOT	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	3,3 $\pm$ 0,7
GESAMT-AUSSCHEIDUNG	8,6 $\pm$ 8,6	11,2 $\pm$ 8,9	68,8 $\pm$ 2,2

TABELLE 6

3.2.2. Verteilung in verschiedenen Geweben

3.2.2.1. Untersuchungen nach subcutaner Injektion von 20 mg/kg

90 und 180 Minuten nach der Behandlung der Tiere lag die Plasmakonzentration (als 1-Butyl-Biguanid ausgedrückt) zwischen 4,5 und 5 µg/ml. Mit Ausnahme der Herz- und Skelettmuskulatur, des Fettgewebes, der Hoden und der Milz wurden nach 90 Minuten in allen übrigen untersuchten Organen signifikant höhere Konzentrationen gemessen. Besonders hoch war der Gehalt in den Ausscheidungsorganen Niere und Harnblase, hier betrug die Konzentration 150 bzw. 325 µg/g FG. Ein siebenfach höherer Gehalt wurde mit 30 µg/g FG in der Leber gemessen. Im Magen-Darm-Trakt, in der Gallenblase, der Lunge, den Nebennieren und der Bauchspeicheldrüse sowie der Haut

lag die Konzentration nur etwa zwei bis viermal so hoch wie im Plasma.

Mit Ausnahme einer sehr starken Abnahme des Radioaktivitätsgehaltes in der Harnblase und Niere und einem mäßigen Abfall in der Leber veränderte sich das Bild bis zur 180. Minute nach der Behandlung nur unwesentlich. Auch zu diesem Zeitpunkt lag die Konzentration in der Skelettmuskulatur nicht signifikant über dem im Plasma gemessenen Wert (Tabelle 7, Abbildung 19 linker Teil).

3.2.2.2. Untersuchungen nach oraler Gabe von 10 mg/kg 24 Stunden nach Applikation dieser niedrigeren Dosis zeigte sich ein etwas anderes Bild. Die Blutkonzentration lag bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Mit Ausnahme des Fettgewebes wurden in allen übrigen untersuchten Geweben signifikant höhere Werte gemessen. Die höchste Konzentration wurde in der Harnblase mit 10,2 $\mu\text{g/g}$ FG ermittelt. Annähernd gleichen Gehalt wiesen der Magen-Darm-Kanal, die Leber und Niere auf (1,3 bis 1,6 $\mu\text{g/g}$ FG). In der Skelettmuskulatur war die Konzentration mehr als viermal so hoch wie im Blut, während 1,5 und 3 Stunden nach Injektion von 20 mg/kg zwischen diesem Gewebe und dem Plasma kein Unterschied festgestellt wurde (Tabelle 8, Abbildung 19 rechter Teil).

Diese Versuche weisen bereits auf Speziesdifferenzen zwischen Ratten und Meerschweinchen hin. Während bei Ratten nach 24 Stunden der Radioaktivitätsgehalt in der Muskulatur höher lag als in der Leber, das nach 3 Stunden gemessene Konzentrationsverhältnis also umgekehrt wurde (siehe Abbildung 1, S. 23), war beim Meerschweinchen unter dem Einfluß beider Dosen sowohl im Kurzzeitversuch als auch nach 24 Stunden in der Le-

Verteilung der RADIOAKTIVITÄT¹⁾ IM ORGANISMUS des MEER-SCHWEINCHENS²⁾ zu verschiedenen Zeiten nach subcutaner Injektion von 20 mg/kg (= 80 μ Ci/kg) 1-BUTYL-BIGUANID- ¹⁴C.

(¹⁾errechnet als μ g 1-Butyl-Biguanid/g Feuchtgewicht oder ml Plasma; (²⁾Behandlung nach 16-stündigem Futterentzug)

$\bar{x} \pm s\bar{x}$; Signifikanz: - : $p > 0,05$; + : $p < 0,05$; ++ : $p < 0,02$

GEWEBE	μ g 1-BUTYL-BIGUANID/g FG(ml Plasma)	
	nach 90 Min. n=5	nach 180 Min n=5
PLASMA	4,693 $\pm$ 0,628	4,935 $\pm$ 2,112
MAGEN signifikant > Plasma	10,246 $\pm$ 1,040 ++	8,289 $\pm$ 1,326 -
DUNNDARM signifikant > Plasma	18,228 $\pm$ 2,024 ++	10,758 $\pm$ 1,981 +
DICKDARM signifikant > Plasma	8,209 $\pm$ 0,813 +	5,979 $\pm$ 1,170 -
HARNBLASE signifikant > Plasma	325,152 $\pm$ 81,655 ++	162,930 $\pm$ 60,290 ++
GALLENBLASE signifikant > Plasma	11,993 $\pm$ 3,661 +	8,233 $\pm$ 2,075 -
HERZ signifikant > Plasma	5,618 $\pm$ 0,448 -	4,745 $\pm$ 0,552 -
SKELETMUSKULATUR signifikant > Plasma	4,564 $\pm$ 0,365 -	5,992 $\pm$ 1,236 -
LEBER signifikant > Plasma	30,379 $\pm$ 4,496 ++	17,643 $\pm$ 4,895 ++
NIERE signifikant > Plasma	150,503 $\pm$ 25,135 ++	90,720 $\pm$ 30,740 ++
FETTGEWEBE signifikant > Plasma	7,450 $\pm$ 2,762 -	9,092 $\pm$ 3,014 -
LUNGE signifikant > Plasma	12,539 $\pm$ 0,809 ++	9,107 $\pm$ 2,034 +
NEBENNIEREN signifikant > Plasma	14,102 $\pm$ 2,567 ++	9,601 $\pm$ 1,687 +
HODEN signifikant > Plasma	5,946 $\pm$ 1,668 -	10,613 $\pm$ 3,647 -
HAUT signifikant > Plasma	8,334 $\pm$ 1,513 +	5,533 $\pm$ 0,636 -
MILZ signifikant > Plasma	8,327 $\pm$ 2,000 -	17,731 $\pm$ 8,242 +
PANKREAS signifikant > Plasma	13,681 $\pm$ 2,612 ++	12,113 $\pm$ 1,794 +

TABELLE 7

Verteilung der Radioaktivität¹
im Organismus des Meerschweinchens
nach einer Behandlung mit 1-Butyl-Biguanid (^{-14}C)²
(But.-Big.)

(¹errechnet als $\mu\text{g But.-Big.}/\text{g FG}$ oder ml Blut ,

²10 mg/kg [$\approx 83,3 \mu\text{Ci}/\text{kg}$])

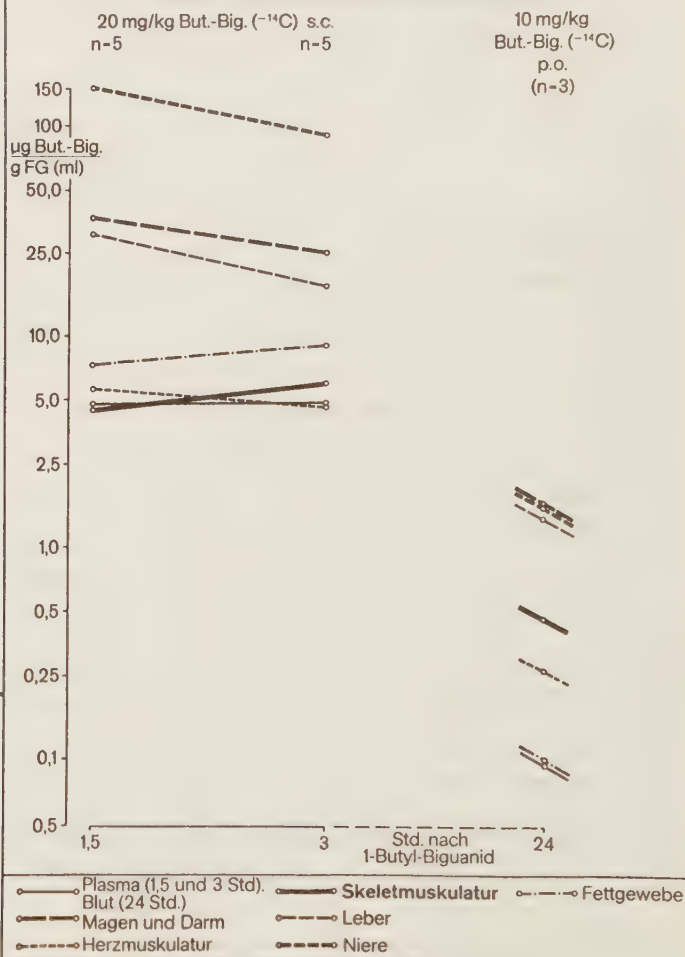


Abbildung 19

Verteilung der RADIOAKTIVITÄT¹⁾ IM ORGANISMUS des MEER-SCHWEINCHENS²⁾ nach oraler Gabe von 10 mg/kg (= 80 µCi/kg) 1-BUTYL-BIGUANID-¹⁴C.

(¹⁾errechnet als µg 1-Butyl-Biguanid/g Feuchtgewicht oder ml Blut; (²⁾Applikation nach 16-stündigem Futterentzug)

[$\bar{x} \pm s\bar{x}$; Signifikanz : - : $p > 0,05$; + : $p < 0,05$; ++ : $p < 0,02$]

	µg 1-BUTYL-BIGUANID/g FG(ml Blut)
GEWEBE	nach 24 Stunden n=3
BLUT	0,096 ± 0,002
MAGEN-DARM-KANAL signifikant > Blut	1,605 ± 0,254 +
HARNBLASE signifikant > Blut	10,248 ± 8,172 +
GALLENBLASE signifikant > Blut	0,508 ± 0,080 +
SKELETMUSKULATUR signifikant > Blut	0,462 ± 0,016 +
HERZ signifikant > Blut	0,265 ± 0,026 +
LEBER signifikant > Blut	1,337 ± 0,291 +
NIERE signifikant > Blut	1,556 ± 0,797 +
FETTGeweBE signifikant > Blut	0,100 ± 0,043 -
LUNGE signifikant > Blut	0,374 ± 0,019 +
NEBENNIEREN signifikant > Blut	0,372 ± 0,082 +
HODEN signifikant > Blut	0,296 ± 0,038 +
HAUT signifikant > Blut	0,186 ± 0,028 +
MILZ signifikant > Blut	0,473 ± 0,077 +

TABELLE 8

ber mehr Radioaktivität nachzuweisen als in der Skelettmuskulatur .Grundsätzlich scheint jedoch auch bei dieser Tierart eine,wenn auch erheblich geringere Anreicherung in der Muskulatur stattzufinden (siehe Abbildung 19).Um hierüber genaueren Aufschluß zu gewinnen wurde ebenfalls wie bei Ratten die intrazelluläre Konzentration der Aktivität in der Leber und Skelettmuskulatur geschätzt.

3.2.3.Vergleich der Radioaktivität im Blut und Plasma
Da bei den 24 Stunden nach der Behandlung mit 10 mg/kg durchgeführten Versuchen lediglich die Radioaktivitätskonzentration im Blut bestimmt worden war,wurde zunächst geprüft,ob Unterschiede zwischen dem Gehalt im Blut und Plasma bestehen.

Wie aus der Tabelle 9 hervorgeht, konnte keine Differenz zwischen der Konzentration an Aktivität im Blut und im Plasma festgestellt werden.Der auf Tabelle 8 angegebene Wert (0,096 µg/ml Blut) wurde daher für die Berechnung der intrazellulären Konzentrationen verwendet.

Vergleich der RADIOAKTIVITÄT¹⁾ im BLUT und im PLASMA von MEERSCHWEINCHEN nach oraler Gabe von 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C (10 mg/kg;80 µCi/kg).

[$\bar{x} \pm s\bar{x}$; Signifikanz: - : $p > 0,05$; ¹⁾errechnet als µg 1-Butyl-Biguanid/ml Blut oder Plasma]

	µg 1-BUTYL-BIGUANID/ml
	nach 24 Std n=4
BLUT	0,080 ± 0,004
Signifikanz	-
PLASMA	0,073 ± 0,006

TABELLE 9

3.2.4. Eiweißbindung von 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C im Plasma

Die Eiweißbindung wurde entsprechend den nach 90 Minuten, 3 und 24 Stunden im Blut bzw. Plasma ermittelten Werten bei zwei hohen und einer niedrigen Konzentration bestimmt.

Bei allen drei Versuchen wurden nahezu identische Ergebnisse erzielt. Ebenso wie bei Ratten ist offenbar auch bei Meerschweinchen die Eiweißbindung von 1-Butyl-Biguanid konzentrationsunabhängig. Sie lag im Mittel bei 17,5 % (Tabelle 10).

EIWEIßBINDUNG von 1-BUTYL-BIGUANID- ^{14}C im PLASMA von MEERSCHWEINCHEN.

(Jeder Wert ist das Mittel aus 2 Bestimmungen mit dem Plasma verschiedener Tiere.)

PLASMAKONZENTRATION ($\mu\text{g/ml}$)	EIWEIßBINDUNG (in % der Plasmakonz.)
0,10	18,65
3,00	17,22
5,00	16,62
	$\bar{x} = 17,50$ $s\bar{x} = 0,60$

TABELLE 10

3.2.5. Schätzung der intrazellulären Radioaktivitätskonzentrationen in der Leber und Skelettmuskulatur

Die Schätzung der intrazellulären Radioaktivitätskonzentrationen in der Leber und Skelettmuskulatur erfolgte aus den Mittelwerten der auf Tabelle 7 und 8 angegebenen Daten unter Berücksichtigung eines Gesamtwasser-
gehaltes der Leber und Skelettmuskulatur von 74,26 bzw.

77,38 %, einer Eiweißbindung von 17,50 % und eines Extrazellulär-raumes in den beiden Geweben von 16,98 und 12,48 %.

Aufgrund dieser Berechnungen wurden als intrazelluläre Konzentrationen in der Leber nach 90 Minuten und 3 Stunden bei den mit 20 mg/kg (s.c.) behandelten Tieren Werte von 52 und 30 $\mu\text{g/ml}$ ($= 268$ und $153 \cdot 10^{-6}\text{M}$) ermittelt. Die extrazelluläre Konzentration lag nach dieser Schätzung bei 4 $\mu\text{g/ml}$ ($= 20 \cdot 10^{-6}\text{M}$). Dies bedeutet, daß unter dem Einfluß dieser hohen Dosen in den Leberzellen eine etwa sieben- bis vierzehnfache Anreicherung gegenüber der Extrazellulärflüssigkeit angenommen werden kann. Unter den gleichen Versuchsbedingungen dürfte die intrazelluläre Konzentration in der Skelettmuskulatur mit 6,3 $\mu\text{g/ml}$ ($= 33 \cdot 10^{-6}\text{M}$) und 8,5 $\mu\text{g/ml}$ ($= 44 \cdot 10^{-6}\text{M}$) nur etwa 1,5 bis 2mal so hoch gelegen haben wie die außerhalb der Zellen (Tabelle 11).

Dagegen war 24 Stunden nach Behandlung mit 10 mg/kg der intrazelluläre Gehalt in der Muskulatur mit 0,7 $\mu\text{g/ml}$ ($= 3,6 \cdot 10^{-6}\text{M}$) fast neunfach höher als im extrazellulären Raum. Daraus geht hervor, daß auch bei Meerschweinchen grundsätzlich eine Anreicherung in der quergestreiften Muskulatur angenommen werden kann. Sie ist allerdings geringer als in der Leber, in der zu diesem Zeitpunkt eine intrazelluläre Konzentration von 2,3 $\mu\text{g/ml}$ ($= 11,9 \cdot 10^{-6}\text{M}$) geschätzt wurde, die damit fast dreißigmal so hoch lag wie der extrazelluläre Gehalt (0,08 $\mu\text{g/ml}$ $= 0,4 \cdot 10^{-6}\text{M}$) (Tabelle 11).

Konzentration der RADIOAKTIVITÄT¹⁾ im intra- und extrazellulären Flüssigkeitsraum (IZF, EZF) der LEBER und SKELETMUSKULATUR von MEERSCHWEINCHEN nach Behandlung mit 20 mg/kg (s.c.) oder 10 mg/kg (p.o.) 1-BUTYL-BIGUANID-¹⁴C.

1) Errechnet als µg/ml IZF und EZF aus den Mittelwerten der Gewebs- und Blut (Plasma)konzentrationen.

Folgende Daten wurden hierfür verwendet ($\bar{x} \pm s\bar{x}$):

- (1) Eiweißbindung : $17,50 \pm 0,60 \%$
- (2) Gesamtwassergehalt der Leber : $74,26 \pm 0,48 \%$
Gesamtwassergehalt der Muskulatur : $77,38 \pm 0,25 \%$
(Ermittlung der Werte an den mit dem Biguanid behandelten Tieren.)
- (3) Extrazellulärraum der Leber : $16,98 \pm 0,82 \%$
Extrazellulärraum der Muskulatur : $12,48 \pm 0,43 \%$
(nach Daten von LOSERT, SENFT und SENFT, 1964, die an Ratten gemessen wurden)

	1,5 Std		3 Std		24 Std	
	20 mg/kg s.c.		10 mg/kg p.o.			
	µg/ml	$\times 10^{-6}M$	µg/ml	$\times 10^{-6}M$	µg/ml	$\times 10^{-6}M$

LEBER

IZF	51,8	268,2	29,6	152,9	2,311	11,9
EZF	3,9	20,0	4,1	21,0	0,079	0,4
$\frac{IZF}{EZF}$	13,4		7,4		29,3	

SKELETMUSKULATUR

IZF	6,3	32,5	8,5	43,7	0,697	3,6
EZF	3,9	20,0	4,1	21,0	0,079	0,4
$\frac{IZF}{EZF}$	1,6		2,1		8,8	

TABELLE 11

4. DISKUSSION

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß 1-Butyl-Biguanid bei Ratten nach Applikation niedriger, nicht blutzucker-senkender Dosen in der Skelettmuskulatur angereichert wird. Dies wurde durch die Bestimmung der Radioaktivitätskonzentrationen im Gewebe und Plasma bzw. Blut nach Behandlung mit 10 mg/kg Körpergewicht nachgewiesen. Auch die Ganztierautoradiographie, die unter dem Einfluß der gleichen Dosis durchgeführt wurde, und die Mikroautoradiographie, die nach Applikation einer höheren, aber ebenfalls noch nicht toxischen Dosis vorgenommen wurde, sprechen für eine Konzentrierung der Radioaktivität in der Muskulatur.

Untersuchungen über die Verteilung und Ausscheidung von 1-Butyl-Biguanid beim Menschen und bei der Ratte wurden bisher von BECKMANN veröffentlicht (BECKMANN, 1964; BECKMANN, 1965; BECKMANN und HÜBNER, 1965; BECKMANN, 1966; BECKMANN, 1968a; BECKMANN, 1968b). Aus diesen Untersuchungen, die bei Ratten nach oraler Verabreichung von 50 mg/kg 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C durchgeführt wurden, geht hervor, daß, in ähnlicher Weise wie bei in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten, die absolute Konzentration in der Muskulatur, ausgedrückt in $\mu\text{g/g}$ FG, in den ersten Stunden nach der Behandlung zwar im Gegensatz zu anderen, für den Kohlenhydratstoffwechsel wichtigen Geweben (Leber und Niere), nicht sehr stark ansteigt, jedoch nur langsam wieder abnimmt. Nach 24 Stunden betrug das Konzentrationsverhältnis zwischen Muskel und Leber etwa 2,2, während nach einer Stunde in der Leber ein neunzehnfach höherer Gehalt an Radioaktivität gemessen wurde als in der Skelettmuskulatur (BECKMANN, 1965). Die weitgehende Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen von BECKMANN und den vorliegenden Untersuchungen zeigt sich trotz unterschiedlicher Dosen auch darin, daß bei beiden Studien bis zur 24. Stunde mehr als 80 % der eingegebenen Aktivität mit Urin

und Kot eliminiert worden waren.

Ähnliche Befunde wurden von HALL, RAMACHANDER und GLASSMAN (1968) nach Behandlung von Ratten mit Phenformin-¹⁴C mitgeteilt. Sowohl bei normalen wie bei diabetischen Tieren wurde nach intraperitonealer Injektion von 50 mg/kg der Substanz von der 1. bis zur 24. Stunde eine nahezu gleichhohe Radioaktivitätsmenge in der quergestreiften Muskulatur nachgewiesen, während in der Leber und Niere die anfangs z.T. erheblich höheren Konzentrationen auf sehr niedrige Werte abnahmen. Bis zu diesem Zeitpunkt hatten die Tiere etwa 60 bis 65 % der verabreichten Radioaktivität mit dem Urin wieder eliminiert. Über die Ausscheidung im Stuhl erfolgten keine Angaben.

Da sowohl bei den Untersuchungen von Beckmann als auch bei den in dieser Arbeit veröffentlichten Experimenten nur die Gesamtaktivität bestimmt wurde, kann nicht entschieden werden, ob die in der Muskulatur angereicherte Verbindung unverändertes 1-Butyl-Biguanid darstellt oder irgendein Stoffwechselprodukt. 50 % des Biguanids werden von der Ratte unter Einführung einer Hydroxygruppe zu 1-(3-Hydroxy-Butyl)-Biganid metabolisiert (BECKMANN, 1966). Diese Verbindung wirkt auch in hohen Dosen nicht mehr blutzuckersenkend.

Trotz dieser Einschränkung ist es jedoch auffällig, daß die Radioaktivität gerade in dem Gewebe angereichert wird, das nach den Untersuchungen von KRAAZ (1971), SCHILLINGER, KRAAZ, LOGE und LOSERT (1970), LOSERT, KRAAZ, JAHN und RILKE (1970), LOSERT, SCHILLINGER, LOGE und KRAAZ (1970), sowie LOSERT, KRAAZ und SCHILLINGER (1971) als Ort der "therapeutischen" Biguanidwirkung angenommen werden muß. Die Befunde dieser Autoren sprechen dafür, daß Biguanide in niedrigen Dosen den Effekt von Insulin auf die zelluläre Aufnahme der Glucose und damit ihren Einbau in das Muskelglykogen sowie ihre Oxydation zu CO₂ fördern.

Ein derartiger Effekt der Biguanide würde voraussetzen, daß sie ihre Wirkung an der Zellmembran in der Muskula-

tur ausüben, da Insulin dort den aktiven Glucosetransport stimuliert. Exakte Angaben über die subzelluläre Lokalisation der Radioaktivität im Muskelgewebe lassen sich zwar aus den mikroautoradiographischen Experimenten nicht ableiten, aufgrund der bereits dargelegten Überlegungen könnten die auf den Bildern erkennbaren Schwärzungen aber durchaus als ein Hinweis auf eine Bindung der Radioaktivität an die Zellmembran gedeutet werden.

Eine Beziehung zwischen Lokalisation und Wirkung der Substanz ist auch bei den an Meerschweinchen durchgeführten Versuchen erkennbar. Nach Vorbehandlung mit 1-Butyl-Biguanid oder Phenformin in nicht blutzuckersenkenden Dosen wurde auch bei diesen Tieren eine Steigerung der peripheren Glucoseaufnahme und -oxydation beobachtet. Allerdings war der Effekt im Vergleich zu Ratten erheblich geringer (LOSERT, KRAAZ, JAHN und RILKE, 1970; LOSERT, KRAAZ und SCHILLINGER, 1971). Hiermit stimmt überein, daß 24 Stunden nach Behandlung mit 10 mg/kg 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C in der Skelettmuskulatur von Meerschweinchen eine zwar signifikante, jedoch gegenüber Ratten geringere Anreicherung der Radioaktivität nachgewiesen wurde. Auch die Befunde von HALL, RAMACHANDER und GLASSMAN (1968) zeigen, daß sich die Radioaktivität in der Skelettmuskulatur von Meerschweinchen nach Applikation von Phenformin- ^{14}C weniger anreichert als bei Ratten.

Gegen die an Ratten nach Behandlung mit 17,5 und 30 mg/kg von LOSERT und Mitarbeitern nachgewiesene Steigerung der peripheren Glucoseaufnahme und -utilisation kann eingesetzt werden, daß diese Dosen zwar noch nicht für eine als toxisch anzusehende Blutglucoseerniedrigung ausreichen, aber noch erheblich über dem zur Behandlung eines Diabetikers notwendigen Bereich liegen. Aus diesem Grunde ist ein Vergleich zwischen den beim Menschen nach Gabe therapeutischer Dosen gemessenen Serum- bzw. Blutkonzentrationen, dem bei der vorliegenden Studie ermittelten Radioaktivitätsgehalt

im Rattenblut, sowie den aus in vitro-Versuchen bekannten Hemmkonzentrationen interessant, die die Gluconeogenese in der Leber und Niere herabsetzen und in der Muskulatur den Glucoseverbrauch durch Steigerung der Glykolyse, bei gleichzeitiger Vergiftung des oxydativen Stoffwechsels, erhöhen.

Nach Befunden von BECKMANN und HÜBNER (1965) wird beim Menschen nach Einnahme von 100 mg 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C eine Serumkonzentration von $2 \cdot 10^{-6}\text{M}$ erreicht. Aufgrund weiterer Angaben dieses Autors (BECKMANN, 1964; BECKMANN, 1966), sowie nach einer Mitteilung von SÖLING (1968), wurden bei Diabetikern, die 1-Butyl-Biguanid erhalten hatten, Plasmaspiegel zwischen 0,5 und 1,0 $\mu\text{g/ml}$ ($= 2,55 \cdot 10^{-6}\text{M}$ bis $5,1 \cdot 10^{-6}\text{M}$) gemessen. In der gleichen Größenordnung liegen die bei Ratten drei Stunden nach oraler Applikation von 10 mg/kg 1-Butyl-Biguanid- ^{14}C ermittelten Werte. Diese Dosis ist zwar etwas geringer als zur Verstärkung der Insulinwirkung erforderlich ist. Jedoch dürften unter der Voraussetzung einer linearen Beziehung zwischen Dosis und Plasmagehalt nach Applikation der wirksamen Dosen von 17,5 und 35 mg/kg höchstens 2 bis 3,5fach höhere Konzentrationen im Plasma ($6 \cdot 10^{-6}\text{M}$ bis $1,2 \cdot 10^{-5}\text{M}$) auftreten.

Aus den Mitteilungen einer großen Anzahl von Autoren, die den Einfluß von 1-Butyl-Biguanid und Phenformin auf den Stoffwechsel der Leber und Niere in vitro untersucht haben, geht hervor, daß zur Erzeugung einer deutlichen Hemmung der Gluconeogenese und Pyruvatoxydation sowie einer Steigerung der Laktatabgabe und des Laktat-Pyruvat-Quotienten erheblich höhere Konzentrationen im Inkubations- oder Perfusionsmedium erforderlich waren (je nach Versuchsanordnung zwischen 10^{-4} und $4 \cdot 10^{-3}\text{M}$) (SÖLING, 1965; SÖLING, KNEER, MOSHAGEN, SKUTELLEA und CREUTZFELDT, 1967; PATRICK, 1966; PATRICK, 1968; ALTSCHULD und KRUGER, 1968; TOEWS, KYNER, CONNOR und CAHILL, 1970; LOSERT und LOGE, 1969). Eine Ausnahme bilden nur die Befunde von MEYER, IPAKTCHI und CLAUSER (1967).

Diese Autoren fanden, daß Phenformin die Glucoseneubildung durch Nierenschnitte von Ratten bereits in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ hemmt, wenn als Substrat Natriumglutamat zugesetzt wurde. Für eine Hemmung der Gluconeogenese aus Pyruvat waren dagegen erheblich höhere Konzentrationen (10^{-4} bis 10^{-3} M) erforderlich. Beim Studium der Biguanid-Wirkung auf den Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber, d.h. einer Präparation, die mehr den in vivo herrschenden Bedingungen entspricht als eine Inkubation von Gewebsschnitten, beobachteten SÖLING und Mitarbeiter (SÖLING, 1965; SÖLING, MOSHAGEN, SKUTELLA und CREUTZFELDT, 1967; WILLMS, MOSHAGEN und SÖLING, 1968) dagegen unter dem Einfluß von $2,55 \cdot 10^5 \text{ M}$ ($= 5 \mu\text{g/ml}$) 1-Butyl-Biguanid keinen Einfluß auf die Glucose-, Laktat- und Pyruvatabgabe der Leber sowie ihren Glykogengehalt. Diese Konzentration liegt noch über derjenigen, die nach Applikation von 35 mg/kg der Verbindung in vivo bei Ratten erwartet werden kann.

Auch an der Herz- und Skelettmuskulatur wurden durch eine Hemmung des oxydativen Stoffwechsels erklärbare Effekte (Steigerung der Glucoseaufnahme infolge Erhöhung der Glykolyse, Erhöhung der Laktatabgabe, Hemmung der Pyruvatoxydation, Hemmung der Sauerstoffaufnahme) erst bei weit höheren 1-Butyl-Biguanid- und Phenformin-Konzentrationen festgestellt (10^{-4} M) (WILLIAMS, TYBERGHEIN, HYDE und NIELSEN, 1957; FORBATH und CLARKE, 1959; WILLIAMSON, WALKER und RENOLD, 1963; JANGAARD, PEREIRA und PINSON, 1968; LOSERT, LOGE und SCHILLINGER, 1969). Widersprechend sind nur die Ergebnisse von DITSCHUNEIT und HOFF (1964), die zwar für eine annähernd gleiche Glucoseaufnahme durch Rattenzwerchfell in vitro eine relativ hohe 1-Butyl-Biguanid-Konzentration benötigten ($1,02 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), den gleichen Effekt jedoch bereits mit der sehr niedrigen Phenforminkonzentration von $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ erzielen konnten. Dieser Wert liegt tiefer als alle von anderen Autoren benötigten Konzentrationen. Worauf diese Diskrepanz beruht, kann aufgrund der Literaturhinweise nicht entschieden werden. Nach Befunden

von BOLINGER, McKEE und DAVIS (1960) ist bei derartig niedrigen Konzentrationen ($2,4 \cdot 10^{-5}$ M) nicht mehr mit einer toxischen Eigenwirkung der Verbindung zu rechnen, sondern mit einer Verstärkung des Insulineffektes auf die Glucoseaufnahme, wie sie als Ursache der therapeutischen Wirkung von Biguaniden vermutet werden kann.

Insgesamt kann daher der Schluß gezogen werden, daß unter dem Einfluß der in den Versuchen von LOSERT und Mitarbeitern verwendeten niedrigen 1-Butyl-Biguanid-Dosen nicht mit toxischen Effekten zu rechnen ist. Die Tatsache, daß zur Verstärkung der Insulinwirkung bei Ratten höhere Dosen notwendig sind als bei Menschen, muß daher entweder auf einem grundsätzlichen Unterschied in der Ansprechbarkeit gegenüber Biguaniden oder auf einer unterschiedlichen Anreicherung dieser Verbindungen in den verschiedenen Geweben beruhen. Da Untersuchungen über die Verteilung von Biguaniden bei Menschen verständlicherweise nicht existieren, kann diese Frage nicht entschieden werden. Unwahrscheinlich ist dagegen, daß Unterschiede im Stoffwechsel der Biguanide beim Menschen und bei der Ratte eine Rolle spielen. 1-Butyl-Biguanid wird zwar beim Menschen im Gegensatz zur Ratte unverändert ausgeschieden, nach Applikation von Phenformin, das beim Diabetiker sogar noch niedriger dosiert wird als 1-Butyl-Biguanid, wurden gleiche Metaboliten beim Menschen und bei der Ratte nachgewiesen (BECKMANN, 1968a, 1968b). Auf der anderen Seite wird 1-Butyl-Biguanid bei Ratten und Meerschweinchen in gleicher Weise metabolisiert (BECKMANN, 1968a, 1968b). Dennoch bestehen, wie bereits erwähnt, erhebliche Unterschiede in der Gewebsverteilung und der Höhe der "therapeutischen" und toxischen Dosen zwischen beiden Spezies.

In gleicher Weise, wie die bei den Versuchen an Ratten nach Gabe einer nicht blutzuckersenkenden Dosis gemessene niedrige Plasmaaktivität gut mit dem Fehlen einer Stoffwechselvergiftung unter dem Einfluß gleicher Konzentrationen in vitro übereinstimmt, wird durch den nach Injektion von 20 mg/kg

bei Meerschweinchen ermittelten 1-Butyl-Biguanid-Gehalt im Plasma ($2 \cdot 10^{-5}$ M) die blutzuckersenkende Wirkung der für diese Tierart toxischen Dosis ausreichend erklärt. JAN-GAARD, PERREA und PINSON (1968) fanden bei Inkubation von Meerschweinchenleberschnitten in vitro, daß die Glucoseabgabe und Pyruvatoxydation durch einen Zusatz von 3,0 bzw. $4 \cdot 10^{-5}$ M Phenformin um 50 % erniedrigt wird. Bei Anwendung von 1-Butyl-Biguanid war hierfür eine etwas höhere Konzentration erforderlich (10^{-4} M). Eine signifikante, etwas geringere Einschränkung der Glucoseabgabe wurde jedoch bereits bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ M beobachtet. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß diese Autoren das Lebergewebe sehr fein zerkleinerten (die Gewebsproben wogen jeweils nur 10 mg). Dadurch dürfte die Struktur einer großen Zahl von Zellen zerstört worden sein, so daß wahrscheinlich die Fähigkeit der Leber zur Anreicherung von Biguaniden, wie sie bei den in dieser Arbeit dargestellten Versuch nachgewiesen wurde, eingeschränkt war. Die intrazelluläre Konzentration, die nach Injektion einer blutzuckersenkenden Dosis von 1-Butyl-Biguanid aufgrund der vorliegenden Untersuchungen in der Meerschweinchen-Leber zwischen $1,5$ und $2,7 \cdot 10^{-4}$ M betragen dürfte, ist jedoch für die Stoffwechselwirkungen dieser Substanz verantwortlich. Um eine ausreichend hohe intrazelluläre Konzentration bei einer Störung der Anreicherung zu erzielen, muß der Biguanidgehalt im Inkubationsmedium erhöht werden.

Bei Experimenten anderer Autoren wurde mit einem erheblich höheren Biguanid-Gehalt ($8,3 \cdot 10^{-4}$ M) eine totale Hemmung der Gluconeogenese in der Leber von Meerschweinchen beobachtet (ALTSCHULD und KRUGER, 1968). Da der Einfluß niedriger Konzentrationen in diesem Fall nicht untersucht wurde, können hieraus keine Schlüsse über Konzentrationswirkungsbeziehungen gezogen werden.

Untersuchungen über den Einfluß von 1-Butyl-Biguanid auf den Stoffwechsel der Skelettmuskulatur (Zwerchfell) von Meerschwein-

chen haben eine gute Übereinstimmung zwischen den in vitro notwendigen Hemmkonzentrationen und dem in vivo beobachteten Serumgehalt der Verbindung ergeben. Nach Angaben von JANGAARD, PEREIRA und PINSON (1968) tritt bei einer Konzentration von 3,3 bzw. $2,5 \cdot 10^{-5}$ M 1-Butyl-Biguanid eine 50 %ige Steigerung der Glucoseaufnahme und eine ebenso starke Einschränkung der Pyruvatoxydation auf. Diese Konzentrationen entsprechen ziemlich genau den in der vorliegenden Arbeit 1,5 und 3 Stunden nach s.c. Injektion von 20 mg/kg im Plasma gemessenen Werten.

Durch diese Befunde wird in eindeutiger Weise die Tatsache bestätigt, daß der Effekt blutzuckersenkender Biguaniddosen auf einer Hemmung der Gluconeogenese und einer Steigerung des Glucoseverbrauches als Folge einer erhöhten Glykolyse bei Einschränkung der Glucoseoxydation beruht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Biguanide erniedrigen bei Ratten und Meerschweinchen dosisabhängig die Glucosekonzentration im Blut. Dieser Effekt beruht auf einer insulinunabhängigen Hemmung der Gluconeogenese in den dazu befähigten Geweben sowie einer Steigerung des Glucoseverbrauches infolge Erhöhung der Glykolyse bei gleichzeitiger Einschränkung der Glucoseoxydation. Beide Effekte können durch die ATP-Abnahme, bedingt durch eine Störung der Zellatmung, erklärt werden. In niedrigen, nicht blutzuckersenkenden Dosen führen Biguanide dagegen zu einer Verbesserung der insulinabhängigen Glucoseaufnahme und -oxydation in der Skelettmuskulatur. Diese Wirkung wurde ebenfalls an Ratten und Meerschweinchen nachgewiesen. Auf einen gleichartigen Mechanismus wird der therapeutische Effekt der Substanzen bei Diabetikern zurückgeführt.
2. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es mit ^{14}C -markiertem 1-Butyl-Biguanid die Ausscheidung und Verteilung der Substanz bei Ratten und Meerschweinchen zu prüfen. Hierbei interessierte vor allem die Frage, ob das Biguanid möglicherweise an seinem Wirkort, d.h. in der Skelettmuskulatur, angereichert wird. Außerdem sollte der Nachweis erbracht werden, daß nach Applikation nicht blutzuckersenkender Dosen im Gegensatz zu einer Behandlung mit Dosen, die die Blutglucose erniedrigen, in vivo keine Biguanidkonzentrationen erreicht werden, von denen aus in vitro-Versuchen eine toxische Beeinflussung des Stoffwechsels bekannt ist.
3. Die Versuche wurden an Ratten und Meerschweinchen durchgeführt. Ratten wurden nur mit nicht blutzuckersenkenden Dosen (im Wesentlichen 10 mg/kg, p.o.) behandelt. Meer-

schweinchen, die auf Biguanide empfindlicher reagieren, erhielten sowohl eine nicht die Blutglucose beeinflussende (10 mg/kg, p.o.) als auch eine im toxischen Bereich liegende Dosis (20 mg/kg, s.c.).

4. Bei Ratten und Meerschweinchen wurde die Ausscheidung und Verteilung im Organismus durch den Nachweis der Radioaktivität im Stuhl, Urin, Blut bzw. Plasma sowie in einer Reihe von Organen studiert (Magen-Darm-Kanal, Harnblase, Herz, Skelettmuskulatur, Leber, Niere, Fettgewebe, Lunge, Nebenniere, Hoden, Haut, Milz, Pankreas und (bei Meerschweinchen) Gallenblase). Zusätzlich wurden bei Ratten Ganztierautoradiographien sowie mikroautoradiographische Untersuchungen der Skelettmuskulatur durchgeführt. Bei den zuletzt genannten Experimenten mußte die applizierte Aktivität gesteigert werden. Die Dosis, die in diesem Fall 90 mg/kg betrug, liegt jedoch ebenfalls noch unter dem toxischen Bereich. Außerdem wurden bei Ratten und Meerschweinchen die intrazellulären Konzentrationen der Aktivität in der Skelettmuskulatur und der Leber geschätzt. Hierfür ist die Kenntnis der Eiweißbindung von 1-Butyl-Biguanid notwendig. Sie wurde bei beiden Tierarten bestimmt. Angaben über die Größe des Extrazellulär-raumes, deren Kenntnis für eine derartige Berechnung auch erforderlich ist, wurden der Literatur entnommen.
5. Ratten schieden innerhalb von 3 Stunden nach Behandlung mit 1-Butyl-Biguanid-¹⁴C 45 % der eingegebenen Aktivität mit dem Kot und Urin wieder aus. Nach 24 Stunden waren mehr als 80 % der verabfolgten Aktivität eliminiert. Im Verlaufe eines weiteren Tages nahm dieser Betrag nicht mehr zu. Mit Ausnahme des Fettgewebes und der Milz wurden in allen untersuchten Geweben sowohl nach 3 Stunden als auch nach 24 und 48 Stunden höhere Konzentrationen im Blut bzw. Plasma gemessen. Während in den meisten Organen

die Radioaktivität mit annähernd gleicher Geschwindigkeit wie im Blut bzw. Plasma abnahm, verringerte sie sich in der Skelettmuskulatur langsamer. Dies zeigte sich besonders deutlich in einer Zunahme des Konzentrationsquotienten zwischen dem intra- und extrazellulären Raum der Skelettmuskulatur, der aus den gemessenen Werten unter Berücksichtigung einer Eiweißbindung von 24,58 % geschätzt wurde. Er stieg von 5,0 (nach 3 Stunden) auf 49,0 bzw. 33,0 nach 24 und 48 Stunden an.

Diese Anreicherung war auch mit der Ganztierautoradiographie nachweisbar, die 0,5, 1, 4, 8 und 24 Stunden nach Applikation der Substanz durchgeführt wurde. Ebenfalls war 24 Stunden nach der Behandlung auf Mikroautoradiographien der Skelettmuskulatur eine deutliche Schwärzung erkennbar. Exakte Aussagen über die subzelluläre Lokalisation waren aber nicht möglich.

6. Prinzipiell gleichartige Befunde wurden auch an Meerschweinchen erhoben, allerdings war das Ausmaß der Anreicherung in der Skelettmuskulatur erheblich geringer. Während 90 und 180 Minuten nach s.c. Injektion einer für diese Tierart hohen, d.h. blutzuckersenkenden Dosis (20 mg/kg), in der Muskulatur kein höherer Gehalt als im Plasma gemessen wurde, war die Konzentration in diesem Gewebe 24 Stunden nach Behandlung mit 10 mg/kg (p.o.) mehr als viermal so hoch wie im Blut. Der unter Berücksichtigung einer Eiweißbindung von 17,5 % geschätzte Konzentrationsquotient zwischen Intra- und Extrazellulärraum betrug etwa 9. Bis zu diesem Zeitpunkt hatten die Tiere nahezu 70 % der applizierten Aktivität im Stuhl und Urin wieder ausgeschieden.
7. Diese Unterschiede in der Anreicherung von 1-Butyl-Biguanid im Muskelgewebe der beiden Tierarten stehen in guter Übereinstimmung mit der Tatsache, daß 1-Butyl-Biguanid bei Ratten die Insulinwirkung auf die periphere Glucoseaufnahme und -utilisation stärker verbessert als bei Meerschweinchen.

8. Die bei Ratten nach Applikation von 10 mg/kg gemessenen Radioaktivitätskonzentrationen im Blut bzw. Plasma liegen weit unter den Konzentrationen, die nach Literaturangaben in vitro die Gluconeogenese in der Leber und Niere hemmen und in der Skelettmuskulatur zu einer Steigerung der Glykolyse und Einschränkung der Glucoseoxydation führen. Das Fehlen toxischer Symptome unter dem Einfluß niedriger Biguaniddosen wird hierdurch erklärt. Umgekehrt werden nach Applikation blutzuckersenkender Dosen bei Meer-schweinchen Plasmakonzentrationen erreicht, deren Größenordnung nach den Befunden anderer Autoren für eine Hemmung der Gluconeogenese, Steigerung der Glykolyse und Einschränkung der Glucoseoxydation ausreichen.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Altshuler, R.A., and F.A. Kruger: Inhibition of hepatic gluconeogenesis in guinea pig by phenformin.
- Atkinson, D.R.: Regulation of enzyme activity.
Ann. Rev. Biochem., 35, 85 (1966)
- Beckmann, R.: Über das Verhalten von Biguaniden im Organismus.
Vortrag auf dem 5. Kongress der International Diabetes Federation, Toronto (1964)
- Beckmann, R.: Resorption und Verteilung im Gewebe und Ausscheidung von 1-Butyl-Biguanid(¹⁴C)-Hydrochlorid.
Arch. Pharm. Forsch., 15, 761 (1965)
- Beckmann, R. und J. Hübner: Zur Pharmakokinetik von 1-Butyl-Biguanid-Hydrochlorid und einer retard-Form dieser Verbindung.
Arch. Pharm. Forsch., 15, 765 (1965)
- Beckmann, R.: Zum biologischen Abbau von 1-Butyl-Biguanid(¹⁴C)-Hydrochlorid (Silubin-¹⁴C).
Arch. int. Pharmacodyn., 180, 161 (1966)
- Beckmann, R.: Zur Pharmakodynamik der Biguanide.
In: 3. Internationales Biguanid-Symposium, herausgegeben von A. Oberdisse, H. Daweke und G. Michael, S.3,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968a)
- Beckmann, R.: The fate of biguanides in man.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 143, 680 (1968b)
- Bolinger, R.L., W.F. McKee and J.W. Davis: Comparative effects of DDI and insulin on glucose uptake of rat diaphragm.
Metabolism, 9, 50 (1960)

- Butterfield, W.J.H., and M.J. Whichelow: Effect of diet, sulphonylureas, and phenformin on peripheral glucose uptake in diabetes and obesity.
Lancet, 2, 785 (1968)
- Butterfield, W.J.H.: The action of biguanide on the peripheral tissues.
In: 2. Internationales Biguanidsymposium, herausgegeben von K. Oberdisse, H. Daweke und G. Michael, S. 33, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968)
- Butterfield, W.J.H.: Effect of biguanides on peripheral tissues.
Acta diabet. lat., 6 (suppl.1), 644 (1969)
- Creutzfeldt, W.: A-Zellveränderungen nach Synthelin und DBI und die Bedeutung des Glucagons für den Wirkungsmechanismus der Guanidin-derivate.
Med. Prob. Pädiatr., IV, 306 (1959)
- Creutzfeldt, W., A. Appels, R. Kattermann, H. Frerichs, H. Proschek, K. Hubrich und H.-D. Söling: Zur Wirkung von Buformin mit und ohne Kombination von Sulfonylharnstoffen auf Gewicht und verschiedene Stoffwechselgrößen bei Diabetikern.
In: 2. Internationales Biguanidsymposium, herausgegeben von K. Oberdisse, H. Daweke und G. Michael, S. 94, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968)
- Ditschuneit, H., W. Lotz, W. Fritzsche und E.F. Pfeiffer: Über den Wirkungsmechanismus blutzuckersenkender Biguanide.
4. Kongreß der International Diabetes Federation, 10.-14.7. 1961. Edition medicine et hygiene, Genève (1961)
- Ditschuneit, H. und F. Hoff: Zum Problem des Wirkungsmechanismus blutzuckersenkender Guanidin-Derivate.
New Istanbul Contribution to Clinical Science, 7, 106 (1964)

- Fajans, R., J.A. Moorhouse, H. Doorenhos, J.L. Lawrence, and W. Conn: Metabolic effects of phenethylbiguanide in normal subjects and diabetic patients. *Diabetes*, 9, 194 (1964)
- Falcone, A.B., R.L. Mac, and E. Shargo: A study of the action of hypoglycemia producing biguanide and sulfonylurea compounds on oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 237, 904 (1962)
- Forbath, W., and D.W. Clarke: The effect of phenethylbiguanide upon the metabolism of the isolated rat diaphragm. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 681 (1959)
- Gomez, F., V. Büber und J.-P. Felber: Veränderungen der Glucosetoleranz und des Insulinspiegels bei gesunden Menschen nach Gabe von N¹-Butyl-Biguanid in Retard-Form. *Klin. Wschr.*, 47, 1313 (1969)
- Gomez, F., and J.-P. Felber: Metabolic effects of butylbiguanide during long lasting intravenous glucose infusion in normal human subjects. *Horm. Metab. Res.*, 2, 72 (1970)
- Gomez, F., L. Jéquier, B. Riedi und J.-P. Felber: Peripheral action of butylbiguanide in man: increased glucose uptake and glucose oxidation. Vortrag auf der 6. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Diabetologie, Warschau, 23.9.-25.9. 1970 *Diabetologia*, im Druck
- Macckel, R., and H. Macckel: Inhibition of gluconeogenesis by phenethylbiguanide in the perfused guinea pig liver. *Fed. Proc.*, 27, 809 (1968)
- Maese, E.: Zur Klinik der Biguanide. *Arzneimittel-Forsch.*, 19, 633 (1969)

- Hall, H.G., Ramachander, and J.M. Glassman: Tissue distribution and excretion of phenformin in normal and diabetic animals.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 140, 601 (1968)
- Jangaard, H.O., J.A. Pereira, and R. Pinson: Metabolic effects of the biguanides and possible mechanism of action.
Diabetes, 17, 96 (1968)
- Kraaz, W.: Tierexperimentelle Untersuchungen zum Mechanismus der antidiabetischen Wirkung von Buformin.
Inauguraldissertation in Vorbereitung, Medizinische Fachbereiche der Freien Universität Berlin (1971)
- Losert, W., C. Senft und G. Senft: Extrarenale Wirkungen des Aldosterons und der Spirolactone.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmacol., 243, 450 (1964)
- Losert, W., O. Loge und E. Schillinger: Untersuchungen zu der durch N¹-(n-Butyl)-Biguanid (Buformin) im Tierexperiment verursachten hypoglykämie.
Sonderdruck aus Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 264, 275 (1969)
- Losert, W., W. Kraaz, P. Jahn und A. Milke: Steigerung der Glucoseoxydation durch Biguanide bei Ratten und Meerschweinchen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., im Druck (1970)
- Losert, W., E. Schillinger, O. Loge, und W. Kraaz: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Biguanide.
Vortrag auf dem 5. Kongreß der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Bonn-Bad Godesberg, 8. und 9.5.1970
Diabetologia, im Druck
- Losert, W., W. Kraaz und E. Schillinger: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirkungsweise von Biguaniden: 2. Stoff-

wechseleränderungen unter dem Einfluß niedriger, nicht blutzuckersenkender Dosen.

In Vorbereitung (1971)

Losert, W., L. Schillinger und W. Kress: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirkungsweise von Biguaniden: 1. Stoffwechseleränderungen unter dem Einfluß hoher, blutzuckersenkender Dosen.

In Vorbereitung (1971)

Mehnert, M.: Zur Biguanidbehandlung bei Altersdiabetikern.

In: 2. Internationales Biguanidsymposium, Internat. Symp. von K. Oberdisse, H. Dancike und G. Michael, S. 94, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968)

Meyer, F., M. Ipaktchi, and H. Clauser: Specific inhibition of gluconeogenesis by biguanides.

Nature, 213, 203 (1967)

Neuhoff, V., F. Kiehl: Dialysiergeräte für Volumen zwischen 10 und 500 µl.

Arzneimittel-Forsch., 19, 1898 (1969)

Otto, H.: Untersuchungen mit Phenyläthylbiguanid (DBI) bei stoffwechselgesunden Menschen.

In Bertram und Michael: Internationales Biguanid Symposium, Thieme Verlag Stuttgart, S. 97, (1960)

Patrick, S.J.: Effects of phenformin and hypoglycin on gluconeogenesis of rat tissues.

Canad. J. Biochem., 44, 27 (1966)

Patrick, S.J.: Renal gluconeogenesis, adenine nucleotides, and enzyme activities.

Canad. J. Biochem., 46, 1345 (1968)

Pfeiffer, E.W., K. Schürffling, und H. Ditschuneit: Der Wirkungsmechanismus der oralen Antidiabetica. Die blutzuckersenkenden Sulfonylharnstoffe und Sulfonamide.

- In: Handbuch des Diabetes mellitus, herausgegeben von E.F. Pfeiffer, Band 1, S. 637, J.F. Lehmanns Verlag, München (1969)
- Pressman, B.C.: Specific inhibitions of energy transfer.
In: energy-linked functions of mitochondria, p.161
Edited by G. Chance, Academic Press, N.Y. (1963a)
- Pressman, B.C.: The effects of guanidine and alkylguanidines on the energy transfer reactions of mitochondria.
J. Biol. Chem., 238, 401 (1963b)
- Rafaelson, O.J.: Action of oral antidiabetic drugs on carbohydrate metabolism of isolated rat diaphragm.
Metabolism, 8, 195 (1959)
- Schäfer, G.: Oligomycinähnlicher Effekt von Biguaniden.
Biochem. Z., 332, 46 (1963)
- Schäfer, G.: The action of biguanides on mitochondrial energy transfer.
Vortrag auf dem 6. Internationalen Biochemie-Kongreß, N.Y. Abstract (1964)
- Schillinger, E., W. Kraatz, O. Loge und W. Losert: Verstärkung der hypoglykämischen Wirkung von Insulin durch Buformin bei Ratten.
Munchn-Schmiedobergs Arch. Pharmak., 266, 437 (1970)
- Searle, G.L., S. Schilling, D. Porte, J. Barbaccia, J. De Grazia, and R.R. Cavalieri: Body glucose kinetics in nondiabetic human subjects after phenethylbiguanide.
Diabetes, 15, 173 (1966)
- Searle, G.L., and R.R. Cavalieri: Glucose kinetics before and after phenformin in the human subject.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 148, 734 (1968)
- Searle, G.L., R. Gulli, and R.R. Cavalieri: Effect of phenformin in nondiabetic humans. Estimation of glucose turn-

- over rate and cori cycle activity.
Metabolism, 18, 146 (1969)
- Söling, H.D. und W. Creutzfeldt: Tiorexperimentelle Untersuchungen zur Pharmakologie und zum Wirkungsmechanismus von N^1 -n-Butylbiguanid.
Internationales Biguanid-Symposium, S. 17, herausgegeben von F. Bertram und G. Michael, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1960)
- Söling, H.D., H. Werchau und W. Creutzfeldt, mentioned by W. Creutzfeldt und H.D. Söling, in: Oral treatment of diabetes.
Springer Berlin, S. 121 (1961)
- Söling, H.D., H. Werchau und W. Creutzfeldt: Untersuchungen zur Stoffwechselwirkung von blutzuckersenkenden Biguaniden bei verschiedenen Tierspezies.
Klaunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac., 244, 290 (1963)
- Söling, H.D.: Der Stoffwechsel der alloxandiabetischen Rattenleber und seine Beeinflussung durch Insulin und orale Antidiabetica, gleichzeitig ein Beitrag zum Problem der Entstehung der diabetischen Ketose.
Habilitationsschrift (1965)
- Söling, H.D., P. Kneer, D. Moshagen, E. Skutella und W. Creutzfeldt: Die Wirkung von N^1 -n-Butylbiguanid auf den Stoffwechsel der isolierten, perfundierten Leber normaler und alloxandiabetischer ketotischer Ratten.
Diabetologia, 3, 377 (1967)
- Söling, H.D.: Unveröffentlichte Befunde, erwähnt in: Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Buformin auf die isolierte perfundierte Leber der Ratte (B. Willms, D. Moshagen und H.D. Söling).
In: 2. Internationales Biguanid-Symposium, herausgegeben

- von K. Oberdisse, H. Daweke und G. Michael, S. 23,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968)
- Söling, H.D. und H. Ditschuneit: Der Wirkungsmechanismus
der oralen Antidiabetica. Die Biguanide.
In: Handbuch des Diabetes mellitus, herausgegeben von
E.F. Pfeiffer. Band 1, S. 685, J.F. Lehmanns Verlag,
München (1969)
- Steiner, D.F., and R.H. Williams: Respiratory inhibition
and hypoglycemia by biguanides and docamethylenediguani-
dine.
Biochem. Biophys. Acta., 30, 325 (1958)
- Sterne, J.: Mecanisme d'action des biguanides antidiabétiques.
La Presse Médicale, 72, 17 (1964)
- Stumpf, W.E., and L.J. Roth: High resolution autoradiography
with dry mounted freeze-dried frozen sections. Comparative
study of six methods using two diffusible compounds
 ^3H -estradiol and ^3H -mesobilirubinogen.
The journal of histochemistry and cytochemistry, 14, 274
(1966)
- Stumpf, W.E., and L.J. Roth: Freeze-drying of small tissue
samples and thin frozen sections below -60°C . A simple
method of cryosorption pumping.
The journal of histochemistry and cytochemistry, 15, 243
(1967)
- Toews, C.J., J.L. Kyner, J.J. Connon, and G.F. Cahill: The
effect of phenformin on gluconeogenesis in isolated per-
fused rat liver.
Diabetes, 19, 368 (1970)
- Tyberghein, J.M., and R.H. Williams: Metabolic effects of
phenethyldiguanide: a new hypoglycemic compound.
Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y., 96, 29 (1957)

- Ullberg, S.: Autoradiographic studies on the distribution of labelled drugs in the body.
Proc. 2nd United Nations Intern. Conf. on the Peaceful Uses of Atomic Energy 24, Teil 1, 248 (Genf 1958)
- Ungar, G.: Pharmacology and toxicology of phenethyldiguanide (DBI). Symposium on "A new hypoglycemic agent, phenformin (DBI)".
Houston, Texas (1959)
- Ungar, G., S. Psychoyos, and H.A. Hall: Action of phenethyldiguanide; a hypoglycemic agent on tricarboxylic acid cycle. *Metabolism*, 9, 36 (1960)
- Weber, E.: Grundriß der biologischen Statistik, S. 501,
S. Fischer-Verlag, Stuttgart (1967)
- Werner, P.: Ergebnisse oraler Diabetestherapie mit Buformin. *Dtsch. Ges.wesen*, 24, 2181 (1969)
- Whiclow, M.J., and W.J.M. Butterfield: In vivo studies in man on the hypoglycemic action of phenformin. *Postgrad. med. J.*, 45 (May Supplement), 24 (1969)
- Williams, R.H., J.M. Tyberghein, P.M. Hyde, and R.L. Nielson: Studies related to the hypoglycemic action of phenethyldiguanide.
Metabolism, 6, 311 (1957)
- Williamson, J.H., R.S. Walker, and A.L. Renold: Metabolic effects of phenethyldiguanide (DBI) on the isolated perfused rat heart.
Metabolism, 12, 1141 (1963)
- Willms, B., D. Moshagen und H.D. Söling: Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Buformin auf die isolierte perfundierte Leber der Ratte.
In: 2. Internationales Diguanid-Symposium, herausgegeben von K. Oberdisse, H. Daweke und G. Michael, S. 23,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968)

Wolff, J.: Die Ultrastruktur des normalen Skelettmuskels
und ihre Beziehung zur Funktion.

Sonderdruck aus Verhandlungen der Deutschen Orthopädischen
Gesellschaft. 54.Kongreß, Köln, 20.-23. 9. 1967

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1968)

Herrn Prof.Dr.med.M.Kramer danke ich für die
Überlassung des Themas.

Herrn Dr.Kolb danke ich für die Anleitung bei
der Durchführung der Versuche,die durch die
Schering AG in großzügiger Weise ermöglicht
wurden.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr.Losert
für die hilfreiche Überwachung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 1. Juni 1945 wurde ich, Gisela Helene Bitterling, als drittes Kind des damaligen Schlossers Kurt Bitterling und seiner Frau Irmgard, geb. Meißner, in Berlin geboren.

Von 1951 bis 1957 besuchte ich die Grundschule und anschließend zwei Jahre lang eine Oberschule Technischen Zweiges. Danach wechselte ich zur Gottfried-Keller-Schule in Berlin-Charlottenburg über, an der ich im Frühjahr 1964 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1964 begann ich das Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin. Hier bestand ich am 11. August 1970 die ärztliche Prüfung mit der Note "sehr gut".

